(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-179495

(43)公開日 平成7年(1995)7月18日

(51) Int.Cl.6

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C 0 7 K 14/435

C 1 2 N

8318-4H

14/705

1/21

8828 - 4B

15/09

ZNA

9281-4B

C 1 2 N 15/00

ZNA A

審査請求 有

発明の数7 OL (全 60 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-185917

(62)分割の表示

特願昭60-505040の分割

(22)出顧日

昭和60年(1985)10月28日

(31)優先権主張番号 666,080

(32)優先日

1984年10月29日

(33)優先権主張国

米国(US)

(31)優先権主張番号 721, 267

(32)優先日

1985年4月8日

(33)優先権主張国

米国(US)

(32)優先日

(31)優先権主張番号 788, 370

(33)優先権主張国

米国 (US)

1985年10月22日

(71)出願人 594134095

マイクロジェニックス コーポレーション

MICROGENICS CORPORA

TION

アメリカ合衆国 カルフォルニア州

94520 コンコード スタンウェル ドラ

イブ 2341

(72)発明者 ヘンダーソン, ダニエル ロパート

アメリカ合衆国 カルフォルニア州

95410 ベニシア チャドウィック ウェ

1 216

(74)代理人 弁理士 八田 幹雄

(54) 【発明の名称】 酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチド

(57)【要約】

【目的】 高い (10⁻¹⁵ M) 感受性において、高分子 量および低分子量 (分子量150 ~30,000ダルトン) の双 方の検体の定量的分析のための酵素相補性検定に使用す る酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリ ペプチドを提供する。

【構成】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよび カルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有 し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナ 一結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは 酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アク セプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体 または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素ア クセプターとの相互作用でB- ガラクトシダーゼの活性 特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポ リペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナ ーポリペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用でβ-ガラクトシダーゼの活*

*性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナーポリペプチド。

【請求項2】 酵素ドナーが下記のアミノ末端で始まるアミノ酸配列を有するものである、酵素アクセプターとの相互作用により β - ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチド:

Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp -X-Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

ただし、Xは Cysまたは Lysである。

【請求項3】 酵素ドナーが図16のBamHI-SalIフラグメントからなり、さらにスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素 20ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用でβ-ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチド。

【請求項4】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ド 30 ナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素ドナーとの相互作用でβ-ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素アクセプターポリペプチド。

【請求項5】 該酵素アクセプターがEA22である請求項4に記載の酵素アクセプターポリペプチド。

【請求項6】 DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with) 請求項1、2または3に記載の酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクター。

【請求項7】 該ベクターが p169、またはその突然 変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である請求項6に記載の組換えベクター。

【請求項8】 請求項6または7に記載のベクターを含む細胞。

【請求項9】 IVIに寄託し、受託番号IVI 10 0.5・2で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細 胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操 作による誘導体。

O 【請求項10】 DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with) 請求項4または5に記載の酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクター。

【請求項11】 該DNAベクターが pF29、または その突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘 導体である請求項10に記載の組換えベクター。

【請求項12】 該DNAベクターが pMG22、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による 誘導体である請求項10に記載の組換えベクター。

【請求項13】 請求項10、11または12に記載のベクターを含む細胞。

【請求項14】 IVIに寄託し、受託番号IVI 10051で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア 細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導体。

【請求項15】 IVIに寄託し、受託番号IVI 10038で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア 細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導40 体。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は、酵素相補性検定による被検体の定性的および定量的分析に関する改良された方法に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドに関するものである。より詳しくは、本発明は、組換えDNA技術および化学的ポリペプチド合成技術の双方により誘導された改変酵素、およびこのような酵素の均質系[homogeneous] および不均質系50 [heterogeneous] のエンザイムイムノアッセイ (酵素免

疫検定法)に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドに関するものである。また組換えDNA誘導された及び化学合成された酵素およびこのような酵素の均質系および不均質系の受容体—配位子 (レセプター -リガンド) 相補性検定に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドをも含むものである。

[0002]

【従来の技術】

免疫検定系について

先行技術は、ヤーロウとベーソン [Yalow and Berson] (1960年, ジェイ. クリン. インベスト., 39:1157 [J. Clin. Invest., 39:1157]) によるラジオイムノアッ セイ (RIA) の開拓的発展に端を発する多くの免疫検 定法 (イムノアッセイ) を教示する。 RIAは、所定量 の特異的抗体に対して所定量の放射性標識された検体を 未知量の標識されていない検体と競合させることによっ て特徴づけられる。抗体に結合したあるいは溶液中に遊 離している放射性検体の量が適当なカウンターにおいて 定量されそして非放射性検体の濃度が決定される。この 20 一般的機構における改良は、(1) 放射性トレーサーの酵 素あるいは螢光トレーサーとの置換、(2) 多クローン性 (ポリクローナル) 動物抗体の単クローン性 (モノクロ ーナル) 抗体との置換、(3) 分光光度計、螢光測光計、 螢光偏光計および粒子数測定器を含む信号検知の改良さ れた方法、ならびに(4) 結合したトレーサーの遊離トレ ーサーからの物理的分離を必要としない均質系の検定法 の導入を含むものである。結合したトレーサーの遊離ト レーサーからの分離は、プラスチック、紙、ガラスある いはアクリルアミドなどのような固形支持体をしばしば 30 必要とするものである。慣例上抗体は、固相に結合し、 一方トレーサーと未知物は溶液中に遊離している。結合 /遊離分離は、固相の1ないしそれ以上の洗浄によって 達成される。残留する結合した活性が次に計測される。 このような検定法は、総じて不均質系の免疫検定法とし て公知である。これに対して、均質系の検定法は、不正 確でかつ時間浪費の分離段階の必要性を除去するもので ある。

【0003】免疫検定法の商業化によって、ラジオイムノアッセイから、酵素結合イムノソルベント検定法(ELI 40 SA)へ、均質系の検定法へ使用されるようになった。この変遷は、スピード、単純性、オートメーションおよび放射能の不在という商業的要求によるものである。均質系の検定法群はいくつかのタイプ、すなわち(1)比濁分析、(2)粒子数測定、(3)螢光消光、(4)螢光偏光および(5)酵素検定法からなるものである。

【0.004】免疫反応を定量化するために光分散を測定する最初の比濁計は、1960年代後半に考案された。これらの初期の比濁計は、新しい化学をもって10年後に改良され、分散角を計測するための角度を下げ反応物

を混合した後の最初の数秒間の間の抗原-抗体反応速度 を計測できるようになった。(ライチェ、アルパーおよ びグレーブス, 1969年, アルスリティス リューム. 1 2: 693; ディートンら, 1976年, クリン. ケム. <u>22</u>:1 465[Ritchie, Alper and Graves, 1969, Arthritis Rheu m. 12:693; Deaton et al., 1976, Clin. Chem. 22:1465]) 。これらの検定法は極めて感受性に貧しくそして例え ば血清 Ig E, Ig Aおよび Ig Mレベルのような、1 0-8Mよりも大きい濃度の検体の測定に適用できるもの である。均質系の粒子数測定検定法においては、直径 0.8μ mのポリスチレン粒子 (ラテックス粒子) が抗 体により被覆される。抗原濃度は、非凝集粒子に対して 凝集粒子を識別し得る装置によって測定されるような凝 集したラテックス粒子の濃度により決定され得る (カン ビアソら、1977年、ジェイ. イムノル. メソ. 18:33[C ambiaso et al., 1977, J. Immunol. Meth. <u>18</u>:33]) 均質 系の螢光消光検定法は、抗原か抗体のいずれかを螢光体 で標識する。検体- 抗体- 螢光体複合体は、抗原-螢光 体あるいは抗体- 螢光体のみのものと比較して著しくよ り低い螢光を発する (ウルマンら, 1979年, ジェイ. バ イオル. ケム. 251:4172[Ullman et al.,1979, J. Bio 1. Chem. <u>251</u>: 4172], 米国特許第 3,998,943号; 同第 3, 996,345号;同第4,174,384 号;同第 4,161,515号;同 第 4,208,479号および同第 4,160,016号)。これらのす べての検定法は、消光の量が試料中の未知の検体あるい は抗体の量に関連するような螢光を消光する種々の方法 を含むものである。これらの検定法は低い感受性のもの である (10⁻¹⁰ Mよりも大きな流体濃度での検体)。 この低い感受性は、内因性血清螢光および静的な非酵素 的拡大様式における螢光の使用によるものである。螢光 偏光検定法は、抗原- 螢光体に結合する抗体によって顕 著に減少する溶液における抗体- 螢光体の自由回転に基 づくものであり、そして低分子量(分子量1000ダルトン 以下)検体で重要な商業的成功を見いだしている (ダン ドリカーら、1973年、イムノケミストリー10:219 [Dand

【0005】種々の免疫検定法はそれぞれ商業的利点および欠点を有している。RIAは感受性がありかつ設定が容易であるが、放射能、分離段階および高価な器械使用を必要とする。酵素あるいは螢光体を用いての不均質系の検定法は、放射能およびいくつかの器械使用をなくすものであるが、分離段階を必要とする。商業的見地からは、いくつかの理由のために分離段階をなくすことが望ましい。分離は、(1) 徹底的な仕事であり、(2) 時間浪費であり、(3) 付加的な装備を必要とし、(4) 結果のばらつきを増加し、そして(5) 高いレベルのオートメーションを妨げるものである。均質系の免疫検定法の多くの商業的利点にもかかわらず、わずかに3つ、すなわちルーベンステインら[Rubenstein et al.]、米国特許第3,817,837号の酵素標識系、バードら、1977年、クリ

liker et. al., 1973, Immunochemistry 10:219])

ン. ケム. 23:1402 [Burd et al.,1977, Clin. Chem. 23:1402] の基質標識系、および螢光偏光 (ダンドリカーら,1973年,イムノケミストリー[Dandliker et al.,1973, Immunochemistry]) が商業的成功を見い出しているにすぎない。しかもなお、これらの3つの検定系は、小さな分子量 (1000以下)の検体に限定されそして検体は10⁻¹⁰ Mよりも大きな濃度において見出される。

【0006】酵素免疫検定系について

酵素免疫検定法は、非常に好首尾なタイプの均質系の免 ・疫検定法である。均質系の酵素免疫検定法のいくつかの 10 別形態が、商業的成功を見出しており、(1) 酵素標識検 体系と(2) 基質標識検体系である。酵素標識検体系にお いては、標識の酵素活性は、特異的抗体が検体- 酵素複 合体を結合した場合に減少される。計測されるべき検体 は、定められた量の検体に関して定められた量の特異的 抗体と競合する。酵素活性は、未知の検体濃度に正比例 する。以下の特許はこの免疫検定系に基づいて発行され た:米国特許第3,817,837 号;同第3,852,157号;同第 3,875,011号;同第3,966,556 号;同第 3,905,871号; 同第 4,065,354号;同第 4,043,872号;同第 4,040,907 20 号;同第 4,039,385号;同第 4,046,636号;同第 4,06 7,774号;同第 4,191,613号および同第 4,171,244号。 この技術の商業化は、低分子量検体および低感受性に限 定されている (10⁻¹⁰ Mより大きな濃度での分子量10 00ダルトンより小さな検体)。

【0007】基質標識螢光免疫検定法は、酵素に関して 螢光発生性の基質への検体の共有結合を含むものであ る。この検体- 基質結合体は、螢光性ではない。抗体の 不在下においては、検体- 螢光発生性基質は酵素により 加水分解され螢光性分子種をもたらす。特異的抗体の存 在下においては、酵素による基質への接近は縮小され、 低減された螢光をもたらす (バードら, 1977年, クリ ン. ケム. <u>23</u>:1402; バードら, アナル. バイオケム. 77:56; ならびにコーエン, ホランダーおよびボグノラ スキー, 1979年, ジェイ. ステロイドバイオケム. 11: 161 [Burd et al., 1977, Clin. Chem. 23: 1402; Burd et a 1., Aual. Biochem. 77:56; and Kohen, Hollander and Bogn olaski, 1979, J. Steroid Biochem. 11:161])。この検定 . 系の商業化は、立体的考慮に帰因して低分子量検体に限 定され、そして上記螢光消光検定法に関するものと同一 40 の考慮に帰因して10⁻¹⁰ Mより大きな流体における濃 度での検体に限定されるものであった。

【0008】限定された商業化に対抗した数多くの均質 系の酵素免疫検定法が述べられてきている。

【0009】米国特許第 4,134,792号は、標識として酵素阻害剤あるいはアロステリックエフェクターなどのような酵素モジュレーターを利用する免疫検定技術を述べている。特異的抗体が酵素モジュレーター標識検体に結合した場合、酵素モジュレーターはもはや酵素の活性を阻害することができない。これゆえ遊離検体による酵素 50

モジュレーター標識検体の競合は、酵素モジュレーター の阻害を回復させる。この分野におけるその他の特許に は、米国特許第 3,935,074号;同第 4,130,462号;同第 4,160,645号および同第 4,193,983 号が含まれる。 【0010】米国特許第 4,213,893号および同第 4,31 8,983号は、補因子- アポ酵素系を用いる酵素免疫検定 法を述べている。特に、ホーンバイら[Hornby et al.] に対して発行された米国特許第 4,318,983号 (1982年 3 月 9日) は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FA D) 標識された結合体とFADが補欠分子族として作用 するアポ酵素を用いる方法を述べている。コリコら[Cor rico et al.]に対して発行された米国特許第 4,213,893 号(1980年7月22日)は、ホーンバイらの方法において 使用するのに適した、例えばFAD標識チロキシンなど のような特定のFAD標識結合体を述べている。FAD 標識結合体は、このような結合体の触媒活性のためにF ADを必要とするアポ酵素とのインキュベーションによ り発生するホロ酵素活性を計測することにより監視され る。検体は、標識された補因子が脱水素酵素とのそれの 反応性を維持するように、FADに共有結合される。 脱 水素酵素活性によって形成される還元FADの量は、検 体に関して特異的な抗体の存在下において減少される。 還元FADの螢光定量的に監視された出現は、検体の量 に正比例するものである (コーエンら、1978年、ホルモ ンと薬剤に関する酵素標識免疫検定法, エス. ビー. パ ル編, ウォルター デギター, ベルリン アンドニュー ョーク, 第67~79頁中[Kohen et al., 1978, in Enzyme-1 abeled Immunoassay for Hormones and Drugs, S. B. Pal, ed., Walter deGuiter, Berlin and New York, pp. 67-7 9])。乳酸脱水素酵素およびジアホラーゼを用いるビオ チンおよび2,4-ジニトロフルオロベンゼン検体に関する 同様の系が述べられている (キャリコら, 1976年, アナ ル. バイオケム. 72:271[Carrico et al., 1976, Anal. B iochem. 72:271])。いずれの系も、分析される血清試料 中に一般に存在する内因性の補因子および酵素からの干

渉になやまされるものである。
【0011】いくつかの酵素がペプチドフラグメントから再形成されることが、観察されてきているが、例えば、リボヌクレアーゼA(リチャードとビサヤシル、1959年、ジェイ・バイオル・ケム・249:1459[Richards and Vithayathi1,1959, J. Biol. Chem. 249:1459])、ブドウ球菌のヌクレアーゼ(ライトら、1974年、ジェイ・バイオル・ケム・249:2285 [Light el al.,1974, J. Biol. Chem. 249:2285])および β -ガラクトシダーゼ(ラングレイとズィアビン、1976年、バイオケミストリー 15:4866[Langley and Zabin,1976, Biochemistry 15:4866])を含むほんのわずかのものしか酵素活性を回復していない。ウシ膵臓のリボヌクレアーゼのズブチリシンによるタンパク質分解は、2つの成分、すなわちペプチド(S-ペプチド)とタンパク質(S-タンパク質)を

産する。S-ペプチドとS-タンパク質のいずれも単独で は、評価し得るリボヌクレアーゼ活性を示さない。これ らの成分が、等モルにおいて混合された場合、ほとんど 完全な酵素活性が回復される。S-ペプチドとS-タンパク 質はKeq=5×10-9Mを有して非常に迅速にかつ強力 に再結合する (リチャードとビサヤシル, 1959年, 上 記)。ブドウ球菌のヌクレアーゼは不活性なペプチドフ ラグメントからの生物学的に活性な酵素の再構築を示 す。完全な149アミノ酸ブドウ球菌のヌクレアーゼ構 造のアミノ酸6~48番を含むヌクレアーゼ-T-(6~4 8) [Nuclease-T-(6-48)] は、ヌクレアーゼーTー (5 $0 \sim 149$) [Nuclease-T- (50-14) 9)] と再結合し、温度変化性のほとんどない 0.03 ~0.05/sの一次速度定数をもつ活性なヌクレアー ゼ-T1を形成する (ライト, 上記)。より詳細に下記 で述べるように(「相補性と β -ガラクトシダーゼ」の 節) 、エシェリキア・コリ [E. Coli] の欠失突然変異 体からのポリペプチドフラグメント (例えばM15) は、熱的処理あるいは臭化シアン処理されたβ-ガラク トシダーゼ酵素から誘導された小さなペプチドフラグメ ントと組合された場合に酵素活性を回復するものである ことが知られている。一方の臭化シアンで生成したフラ グメントはCNBr2と呼ばれ、他方はCNBr24と 呼ばれる。

【0012】より最近になって、このようなポリペプチ ドフラグメントの再結合に基づく免疫検定法が、ファリ ナとゴルケ [Farina and Golke] (1983年 3月29日発行 の米国特許第4,378,428 号) によって、またゴネリら[G onelli et al.] (1981年, バイオケム. アンド バイオ em. and Biophys. Res. Commun , 102:917-923])によって 述べられた。これらの中に開示されたすべての実験的な 例は、リボヌクレアーゼ触媒活性を発生するためのS-ペ ·プチド/S-タンパク質の再結合に基づくものであった。 1つの検体がリボヌクレアーゼの小さなズブチリシン開 裂ペプチド、すなわちS-ペプチド (アミノ酸1-20) に共有結合的に付着された。これは1つの検体と共役さ れ、そして活性なリボヌクレアーゼを再形成するために S-タンパク質 (アミノ酸21-124) と組合される。 この検体に特異的な抗体はリボヌクレアーゼ活性の再形 40 成を阻害する。この検定法はすべてのオートクレーブ減 菌されていない生物学的溶液における内因性リボヌクレ アーゼ活性の存在により限定されるものである。

【0013】この系によって決して応対されないその他 の同様な深刻な欠点としては、連結されるポリペプチド の平衡定数を調整することの不可能性、および高分子量 タンパク質に結合し得る一方、活性な酵素を再形成をも 行ない得る免疫反応性のポリペプチドを作製することの 不可能性が挙げられる。利用されるすべてのポリペプチ ドは活性なリボヌクレアーゼを形成するために再結合し 50 得る新規でない触媒的に不活性なポリペプチドであっ

【0014】CNBr2あるいはM15に1つの検体を 付着させるためのファリナとゴルケ[Farina and Golke] (米国特許第4,378,428 号) によって提唱された化学的 作用でのより顕著な欠点が発見されている。試験された すべての場合において、いずれかのポリペプチド上の有 効なNH₂、COOHおよびSH基を介しての検体の付 着によって、相補し得ないペプチドが生じた。多くのア ミノ、カルボン酸およびスルフヒドリル官能性を有する M15をカップリングすることによって、すべての場合 において (慎重に制御された条件ですら) M15が不活 性化された。動力学は、活性を不活性にするのに十分で ある単一ヒットを示す。CNBr2は内部のリシンを含 んでおらず、1つの非反復の[unique]スルフヒドリル基 および数個のカルボン酸基を含んでいる。ラングレー[L angley] との一致(" β - ガラクトシダーゼ α - 相補 性の分子状態"と題された工学博士論文, ユーシーエル エイ, 1975年[Ph.D. thesis entitled "The Molecular N ature of β -garactosidase α -complementation", UC LA,1975]) において、N-末端α- アミノ基へのカップリ ングによってCNBr2の相補性活性が不活化される。 CNBr2の調製 (ラングレー,フォウラーおよびゼビ ン, 1975年, ジェイ. バイオル. ケム. 250:2587 [Lan gley, Fowler and Zabin, 1975, J. Biol. Chem. 250:258 7]) において、第76位のスルフヒドリルは、臭化シア ン開裂に先だち、還元されそしてヨード酢酸でアルキル 化された。このスルフヒドリルがアルキル化されないと すると、CNBr2活性は精製の段階の初期には維持さ フィズ・レス・コミュン・<u>102</u>:917 ~923[1981,Bioch 30 れ得るが、均質性へと精製する前に失活する。また、こ のスルフヒドリルが、ヨード酢酸の代わりに検体のマレ イミド誘導体でアルキル化されるとすると、結合体の不 溶性が精製をさまたげる。最後に、試験されたすべての 場合において、CNBr2のCOOH部分へのカップリ ングによって、相補性活性が不活性化された。それゆ え、適当な免疫反応性で相補する試薬を調製するために CNBr2およびM15を使用することは困難なことで あると思われる。

> 【0015】<u>相補性とβ- ガラクトシダ</u>ーゼについて 酵素 β- ガラクトシダーゼは、酵素結合イムノソルベン ト検定法(ELISA) (エングバールとペールマン、1971年、 イムノケミストリー 8:871[Engvall and Perlmann, 197 1, Immunochemistry 8: 871]) および均質系の基質標識 検定法(バードら, 1977年, クリン. ケム. 23:1402[B urd et al.,1977,Clin.Chem.23:1402]) において広範な 使用を見出されている。加えて、β-ガラクトシダーゼ は、DNAクローニングおよびDNA配列に関する普及 した遺伝子系の基礎を形成する(メッシング,1983年, メソッツ イン エンザイモロジイ 101:20[Messin g, 1983, Method in Enzymology101: 20]),

【0016】 β - ガラクトシダーゼは、54,000ダルトンに等しい分子量(MW)を有する四量体タンパク質である。4つの同一のモノマーは1021アミノ酸からなり、それぞれ116,000ダルトンのMWを有する。図1に示すような単量体タンパク質は、3つの領域、すなわち(1) N-末端近位セグメント(α - 領域)、(2) 中間領域、および(3) C-末端遠位セグメント(α - 領域)に分けられる。

【0017】β-ガラクトシダーゼから誘導された変異 体ポリペプチドは、適当なβ-ガラクトシダーゼネガテ 10 ィブ変異体の抽出物に添加された場合、相補し得るある いは酵素活性を自発的に回復し得るものとして知られて いる。この現象は、シストロン内相補[intracistronic complementation]として知られる。α- 相補性の一例 は、M15/CNBr2相補系によって提供される。M 15変異ポリペプチドはβ- ガラクトシダーゼのアミノ 酸11~41番を欠いており、そして溶液中において酵 素的に不活性な二量体として存在する。臭化シアン (C NBr) 開裂により β - ガラクトシダーゼから誘導され たポリペプチドは、アミノ酸3~92番から成るもので 20 ある。CNBr2は、二量体M15と混合された場合、 完全な酵素活性を有するβ-ガラクトシダーゼ四量体の 自発的再構築を促進する(ラングレーとゼアビン、1976 年, バイオケミストリー 15:4866[Langley and Zabi n, 1976, Biochemistry <u>15</u>: 4866])。M15ペプチドは α - アクセプター (α - 受容体) として知られており、 またCNBr2は、 α -ドナー (α -供与体) として知 られている。このことは、十分に研究された相補系を表 わしている一方、CNBr2は β - ガラクトシダーゼ中 のアミノ酸23~31番の欠失変異体であるM112二 量体に関するα-ドナーとして与えられ得る(リン,ビ ラレジョおよびゼアビン、1970年、バイオケム、バイオ フィズ. レス. コモン. <u>40</u>:249; セレダとゼアビン, 1979年, バイオケム. 18:404; ウェルフィー, フォウ ラーとゼアビン、1981年、ジェイ、バイオル、ケム、_2 56:6804; ラングレーら、1975年、プロク. ナトル. ア カド. サイ. ユーエスエイ 72:1254[Lin, Villare jo a nd Zabin, 1970, Biochem. Biophys. Res. Commen. 40: 249; Celeda, and Zabin, 1979, Biochem. 18: 404; Welphy, Fow ler and Zabin, 1981, J. Biol. Chem. 256: 6804; Langley 40 et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1254])。その他のα-ドナーとしては、β-ガラクトシダ ーゼをオートクレーブ減菌することにより誘導されたポ リペプチドを含むものである。このペプチドは、しかし ながら、今だ精製されておらずまた配列も知られていな い。M15およびM112以外のα-アクセプターは述 べられていない。CNBr2によるM15の相補の例に おいて、アミノ酸配列3~10番および42~96番は 双方とも酵素的に活性な複合体において二重に存在す る。

【0018】シストロン内相補はまた、 β - ガラクトシダーゼのC-末端(ω - 領域)で起こる。入手できる最もよく知られた配列データは、少なくとも10個のアミノ酸、すなわち1011~1021番を欠失した $X90\omega$ - アクセプターペプチドに関するものである。 $X90ペプチドは単量体として存在し、アミノ酸990~1021番から成る<math>\beta$ - ガラクトシダーゼの臭化シアン消化産物である CNBr24によって相補され酵素的に活性な四量体を再形成し得るものである(ウェルフィーら,1980年,バイオケム・バイオフィズ・レス・コモン・93:23[Welphyet al.,1980,Biochem.Biophys.Res.Common.93:223])。

【0019】<u>B型肝炎ウィルス表面抗原について</u>

B型肝炎ウィルス (HBV) からのDNAはクローニン グされており、そしてプラスミドあるいはん類縁ファー ジ (ラムドイドファージ) ベクターに連結された後に一 連のフラグメントとしておよび完全な鎖状分子としてエ シェリキア・コリ中において増殖されている (バーレル ら,1979年,ネイチャー (ロンドン) 279:43~47;チ ャルネイら,1979年,プロク.ナトル.アカド.サイ. ユーエスエイ $76:2222\sim2226;$ シニンスキーら, 1979 年, ネイチャー (ロンドン) 279:346 ~468[Burrell e t al., 1979, Nature (London) 279: 43-47; Charnay et a 1., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2222-2226; Snins key et al., 1979, Nature (London) 279: 346-468])。続 いて、HBVの表面抗原 (HBV-SAg)がクローニン グされ、そしてエシェリキア・コリにおいて (マッケイ ら,1981年,プロク.ナトル.アカド.サイ.ユーエス エイ <u>78</u>: 4510~4514[Mckayet al., 1981, Proc. Natl. Ac ad. Sci. USA <u>78</u>:4510-4514])、酵母において (バレンゼ ーラら、1982年、ネイチャー 298 : 347 [Valenzuela et al.,1982,Nature 298:347])、および哺乳動物細胞 において (デュボイスら, 1980年, プロク. ナトル. ア カド. サイ. ユーエスエイ 77:4549~4553[Dubois et al., 1980, Proc. Natl. Acsd. Sci. USA 77: 4549-4553]) 発現されている。

[0020]

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高い (10⁻¹⁵ M) 感受性において、高分子量および低分子 量 (分子量150 ~30,000ダルトン) の双方の検体の定量 的分析のための酵素相補性検定に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドを提供することである。

[0021]

【課題を解決するための手段】上記諸目的は、(1) 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシ ル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応 性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵 素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結 50 合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの

競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナーポリペプチドにより達成される。

*【0022】上記諸目的はまた、(2) 酵素ドナーが下記のアミノ末端で始まるアミノ酸配列を有するものである、酵素アクセプターとの相互作用により β - ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドにより達成される:

Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp -X-Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

ただし、Xは Cysまたは Lysである。

【0023】上記諸目的はまた、(3) 酵素ドナーが 図16のBamHI-SalIフラグメントからなり、さら にスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成 る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性 酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプ ターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体 結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合に 20 よるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有 結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用 でβ-ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複 合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドにより達成さ れる。

【0024】上記諸目的はさらに、(4) 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体 30 結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素ドナーとの相互作用でβーガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素アクセプターポリペプチドにより達成される。

【0025】本発明はまた、(5) 該酵素アクセプターがEA22である前記(4)に記載の酵素アクセプターポリペプチドである。

【0026】また、上記諸目的は、(6) DNA配列 の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結 合した(in operative association with) 前記 (1)、

(2)または(3)に記載の酵素ドナーポリペプチドを コードするDNA配列を有する組換えベクターによって も達成される。

【0027】本発明はまた、(7) 上記ベクターが p 169、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(6)に記載の組換えベクターである。

【0028】また、上記諸目的は、(8) 前記 (6) または (7) に記載のベクターを含む細胞によっても達成される。

【0029】さらに、上記諸目的は、(9) IVIに 寄託し、受託番号IVI 10052で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異 体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体によって も達成される。

【0030】さらに、上記諸目的は、(10) DNA 配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効 に結合した(in operative association with) 前記

(4) または(5) に記載の酵素アクセプターポリペプ チドをコードするDNA配列を有する組換えベクターに よっても達成される。

【0031】本発明はまた、(11) 上記DNAベクターが pF29、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(10)に記載の組換えベクターである。本発明はさらに、(12)上記DNAベクターが pMG22、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(10)に記載の組換えベクターである。

【0032】さらに、上記諸目的は、(13) 前記 (10)、(11)または(12)に記載のベクターを 含む細胞によっても達成される。

【0033】さらに、上記諸目的は、(14) IVIに寄託し、受託番号IVI 10051で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変 40 異体、組換え体若しくは誘導体によっても達成される。 【0034】さらに、上記諸目的は、(15) IVIに寄託し、受託番号IVI 10038で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変 異体、組換え体若しくは誘導体によっても達成される。

[0035]

【作用】本発明によると、ポリペプチドは、組換えDNA技術によってあるいは化学的ポリペプチド合成技術によって製造される。 [本明細書中で用いられる場合、

"ポリペプチド"なる用語は、ペプチドとタンパク質を 50 含めたものである。] ポリペプチドそれら自体は、酵素

30

的に不活性であるが、水性媒体中でいっしょに反応した 場合、これらは結合し、相補性として知られる現象を介 して触媒的に活性な酵素を形成する。β-ガラクトシダ ーゼは、これが分光測光法および螢光定量法を用いて検 知できる数個の基質を有しており、従来の商業的免疫検 定法において有用性が示されており、かなり低濃度にお いて計測可能であり、そして遺伝学的に十分特徴づけら れているゆえに、好まれる酵素である。有意でないバッ クグラウンドから酵素活性を生成することによって、高 い信号対ノイズ比が達成される。本発明の改良された検 10 定法において用いられる新規なポリペプチドは、(a) 検 体およびポリペプチドに関してコードする配列を含む組 換え遺伝子の産物である、検体がポリペプチドに融合さ れるものである融合タンパク質;(b) 検体との最適なカ ップリングのために遺伝子操作されたポリペプチド; (C) 検体との最適なカップリングのために化学合成され

【0036】これゆえ、方法は、(1) 相補可能であり、(2) 再結合の平衡定数について組織的に調整され得るものであり、(3) 特異的結合タンパク質と相互作用し得るものであり、そして(4) 特異的結合タンパク質との相互作用によって、β-ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素の形成を制御し得るものである適当なポリペプチドを提供するための組換えDNA技術あるいは化学的ポリペプチド合成技術に基づいた免疫検定法を生み出すことに関して述べられる。

たポリペプチド;および(d) 酸化、熱、 pH、酵素分解

などのような環境因子に対する安定性を改良するために

遺伝子操作されたあるいは化学合成されたポリペプチド

を包含するものである。

【0037】本発明の遺伝子操作されたおよび化学合成されたポリペプチドは、その他の相補する酵素系以上に独特な利点を提供する。組換えDNA技術によって製造されるポリペプチドは、低いコストで大量に生成されることができ、均質性のものに容易に精製でき、そして任意の大きさおよび配列で生成され得るものである。化学合成されるポリペプチド、特にアミノ酸長さにおいて比較的小さなものであるポリペプチドは、高い収率において、制限のない配列変化において生成され得る。いずれの調製技術も、改良されたカップリング化学特性、酵素反応動力学、酵素的検定感受性および/または安定性のポリペプチドを導く、アミノ酸配列の巧妙な操作を提供するものである。

【0038】本発明は、水性媒体中でいっしょにインキュベートされた場合に相補のプロセスによって活性なβ-ガラクトシダーゼ酵素複合体を形成するものであり組換えDNA技術あるいは化学的ポリペプチド合成技術を用いて調製される酵素的に不活性なポリペプチドを用いる、種々の検体に対する改良された検定法において使用する組換えDNAベクターからなるものである。本発明によると、組換えDNA技術は、相補に必要とされる-50

方のあるいは双方を調製するために用いられ得る。この 2 つのポリペプチドは、(1) 酵素アクセプター[enzyme-acceptor] および(2) 酵素ドナー[enzyme-donor]と呼ばれる。DNA合成技術は、種々の長さのポリペプチドに 関してコードする遺伝子配列の調製に適用され得る。酵素ドナーおよび酵素アクセプターは、それらの技術によって調製される。化学的ポリペプチド合成技術は、アミノ酸長さが比較的短いポリペプチドの調製に通常適用が れる。この理由ゆえ、化学的技術は、 β - ガラクトシダーゼ系の酵素ドナーの合成に最も適したものであり、これはこの系の酵素ドナーは、酵素アクセプターに比較してアミノ酸配列において主として短いものであるからである。もちろん、これは、ペプチド合成技術によって、機能的な酵素- アクセプターが調製できないということではない。

【0039】本明細書において定義されるように、酵素アクセプターは、 β - ガラクトシダーゼ遺伝子の欠失変異体によって生成された酵素的に不活性なポリペプチドであって、酵素ドナーと組合された場合に相補のプロセスによって活性な β - ガラクトシダーゼを形成し得るものである。本明細書において構成されたすべての酵素アクセプターは、 β - ガラクトシダーゼタンパク質のN-末端をコード化する β -ガラクトシダーゼ遺伝子の α - 領域においての欠失である。これらの酵素アクセプターのいくつかは、より高い安定性を与えるために、曝れたシステイン残基の除去を介してさらに操作されている。

【0040】本明細書において定義されるように、酵素ドナーは、2つのドメイン、すなわち(1)活性な酵素を形成するために酵素アクセプターと組合せられ得るタンパク質配列を含むα-ドナードメインと(2)検体結合タンパク質[analyte-bindingprotein]と相互作用し得る検体ドメインから成る酵素的に不活性なポリペプチドである。検体ドメインは、(1)検体カップリングドメインあるいは(2)タンパク質ドメインのいずれかである。

【0041】本明細書において定義されるように、検体カップリングドメインは、検体の共有結合のために都合のよい部位を提供するためにポリペプチド中に挿入あるいは置換されたアミノ酸で構成される。この化学的なカップリング部位は、最も頻繁には、シスチンあるいはリシン残基に関連するスルフヒドリルあるいはアミノ基であるが、(a) 相補のプロセスあるいは(b) 検体の検体結合タンパク質との相互作用によって干渉されることなく検体に結合し得る任意のアミノ酸の任意の適当な化学的反応性基であり得る。化学的反応性基の位置は、検定法の立体障害要求に合致するように変えられ得る。

【0042】本明細書において定義されるように、タンパク質ドメインは、タンパク質抗原あるいは抗原の免疫反応性基 (エピトープ) からなるものである。例えば、腫瘍性、細菌性、真菌性、ウィルス性、寄生体性、マイコプラズマ性、組織適合性、分化およびその他の細胞膜

抗原類、病原体表面抗原、毒素類、アレルゲン類、薬剤 類ならびに、ゴナドトロピンホルモン、卵胞成熟ホルモ ン、甲状腺刺激ホルモン、フェリチンもしくは検体に相 当するあるいは類似する任意のその他の抗原性分子を含 む (もちろんこれらに限定されるわけではない。) 任意 の生物学的に活性な分子などのような抗原が、可能なも のである。本明細書において定義されるように、検体ド メインがタンパク質ドメインである酵素ドナーはまた

"融合タンパク質"と呼ばれる。遺伝子工学によって構 築されたすべての酵素ドナーが、α-ドナードメインと 10 検体ドメインを有する融合タンパク質をコード化する遺 伝子融合を表わすものであるが、本明細書において定義 されるような"融合タンパク質"なる用語は、α-ドナ ードメインとタンパク質抗原の免疫反応性エピトープを 特異化するタンパク質ドメインとから構成されるものの みに適用できるものである。〔もちろん、タンパク質ド メインに関して、ある抗体以外のある検体結合タンパク 質と相互作用し得る非免疫反応性タンパク質あるいはそ のフラグメントから成ることは可能である。] 融合タン パク質のタンパク質ドメインは、検体ドメインが検体力 ップリングドメインであるものにおいては必要であるよ うな、検体ドメインへの検体の共有結合の必要性を除去 するものである。これは、融合タンパク質のタンパク質 ドメイン部分が、本質的に、検体結合タンパク質に関し て遊離検体と競合し得る検体 (あるいは、少なくともそ の近類似体)であるゆえである。

【0043】試料あるいは媒体中に含まれる検体に対す る任意の酵素検定法におけるように、検定混合物中に試 薬として含まれる検体結合タンパク質は、遊離検体およ び、酵素ドナーの検体ドメインにカップリングしたある いは検体ドメインの一部として融合した検体の双方と、 競合的に相互作用するあるいは組合せするものでなけれ ばならない。酵素ドナーにカップリングしたあるいは酵 素ドナー中に融合した検体(以下"酵素ドナー結合体[e nzyme-donor conjugate]"と呼ぶ) との検体結合タンパ ク質の相互作用は、酵素ドナーと酵素アクセプターとの 相補のプロセスを阻止するものでなければならない。 本* *明細書において定義されるように、検体結合タンパク質 は、従来の(多クローン性)および単クローン性抗体 (およびそのフラグメント)を含む特異的抗体分子、レ セプター、輸送タンパク質、レクチン、ならびにアビジ ン、チロキシン結合グロブリンなどを含む(もちろんこ れらに限定されるわけではない。) その他の結合タンパ ク質を含むものである。本明細書において定義されるよ うに、検体結合タンパク質なる用語は、糖タンパク質、 リポタンパク質などのようなタンパク質様物質を包含す るものである。

【0044】本発明による改良された酵素検定法は、競 合的結合機構に基づくものである。本発明によると、カ ップリングされたまたは融合された関心の検体 (あるい は類似検体誘導体) からなるβ- ガラクトシダーゼ系の 酵素ドナー(すなわち酵素ドナー結合体)の既知量が、 特異的検体結合タンパク質の既知量および酵素ドナーと 相補し得る酵素アクセプターの既知量を合せたもので る。特異的検体結合タンパク質の既知量に対する試料中 の酵素ドナー結合体の検体ドメインと遊離未知検体との 競合によって、酵素ドナー結合体は酵素アクセプターに 結合するように遊離する。酵素ドナー結合体と酵素アク セプターとの会合[association] は、触媒的に活性な酵 素複合体の形成をもたらし、これゆえ、試料中に検知で きるβ-ガラクトシダーゼ酵素活性が監視される。結果 的に、試料中の遊離検体の量は、計測可能な酵素活性の 正比例関数として決定される。酵素活性は、酵素触媒反 応による基質転化の速度を、分光測光法および螢光定量 法などを含む(もちろんこれらに限定されるわけではな い。) 種々の技術の任意なものによって監視することに より計測される。本発明の検定法の競合的反応は以下の 反応式(1)~(3)で表わされる。

【0045】なお、以下の反応式(1)~(3)において、 検体、酵素- ドナー結合体、酵素アクセプター、検体結 合タンパク質、およびβ-ガラクトシダーゼ酵素はそれ ぞれA;ED~A;EA;AbpおよびEで表わされる。

[0046]

【化1】

(1) A + Abp A - Abp $ED\sim A-Abp$ (2) $ED\sim A+Abp$

式中K2aおよびK2aは、酵素ドナー結合体と検体結合タンパク質 の会合および解離の定数を表わすものである。

[0047]

【化2】

(3) $ED \sim A + EA$

Ka4

式中、 K_{3a} および K_{3d} は、酵素ドナー結合体と酵素アクセプター ポリペプチドとの会合および解離の定数を表わすものである。

10 あろう。

【0048】検体結合タンパク質 (Abp) の酵素ドナー 結合体(ED~A)上の接近可能な決定基への結合は、 酵素アクセプターが不活性な二量体をとどめるように相 補性反応を阻害する。

【0049】これゆえ以下の式の反応式(2)は、以下の 反応式(3) と競合する。

[0050]

【化3】

(2) $ED\sim A+Abp$ Z ED~A−Abb

[0051]

【化4】

[0054] (3) $ED \sim A + EA$ **≠** E 【化5】

(4) $ED \sim A - Abp + EA \rightleftarrows ED \sim A - Abp - EA$

(5)

式中、ED~A: AbpおよびEAは上記と同様のものであり、 また活性な酵素(E)により触媒される反応に関する基質および 産物はそれぞれSおよびPで表わされる。

【0055】十分な感受性を有する特別な検定法を設計 素- アクセプターに関する会合定数 (Ksa);(2)特異 的検体結合タンパク質の濃度([Abp]);(3)特異的 検体結合タンパク質および酵素ドナー結合体に関する会 合定数 (K2a);ならびに酵素アクセプターの濃度

※【0056】ファリナとゴルケ[Farina and Golke] (米 するための臨界成分は、(1) 酵素ドナー結合体および酵 30 国特許第4,378,428 号)によって提唱された次の不等式 は、特別の検定法を設計することにおける指針として用 いられ得る。

[0057]

【化6】

([EA]) の間の関係である。

*

 $- \ge [EA] \ge [ED \sim A] + K_2$

式中、K, およびK, は反応(1) および(3) に関する平衡定数を 表わし、また [Abp] 、 [EA] および [ED~A] はそれぞれ、 検体結合タンパク質、酵素アクセプターの濃度および検体にカップ リングした酵素ドナーの濃度である。この分析は、上記反応(1) および(2) に関する平衡定数は同一であることおよび反応(4) お よび(5) は全く進行しないことを仮定する。

【0058】ファリナとゴルケ (上記) によってより詳 細に説明されるように、式K₃ [Abp] / K₁ が [E A] よりも約2~100倍、好ましくは約5~25倍大 50 体濃度のものの約10~100倍の因子にあるべきであ

きいものであるように、検定が設計されることが通常望 ましい。さらにED~Aの濃度は、予想される未知の検

18

*【0052】Abp、ED、AおよびEAの既知量を用い

ると、複合される β - ガラクトシダーゼ「E」の活性

は、試料中の関心の遊離検体の未知濃度に正比例するで

【0053】従来の酵素検定法におけると同様に、十分

な感受性のためには、検体結合タンパク質にカップリン

グした酵素ドナー結合体の酵素- アクセプターとの相補

による活性な酵素の形成が最小限なものとされなければ

ならない。 言い換えれば、以下の反応式(4) および(5)

のいずれかあるいは双方は、わずかに最小限で進行する

かあるいは全く進行しないものでなければならない。

る。これは、検定されるべき試料中における変化する検体濃度に対して満足に応答する、反応(3)において形成される触媒的に活性な酵素の量をもたらすものである。【0059】本発明による酵素相補性検定法の成分は、水性媒体あるいは凍結乾燥形態のいずれかにおけるキット中に包装され得る。それぞれの成分ないしは試薬は、別々に、または検定の感受性が変化されずかつ成分が悪影響を及ぼされない限りにおいて他方の成分といっしょに包装され得る。このキットの1つの商業的実施態様は、クローン化酵素ドナー免疫検定法[Cloned Enzyme-D 10 oner Immunoassay][CEDIA ™]と呼ばれる。

【0060】醛素ドナー

本発明によると、改良された酵素検定法は、組換えDN A技術および/または化学的ポリペプチド合成技術を用いて調製された酵素ドナーおよび酵素アクセプターの使用により達成される。このような技術は、適当な反応性基、例えばアミノ、スルフヒドリル、カルボキシルなどを有するアミノ酸の挿入あるいは置換により、酵素ドナーと検体の間の共有結合に関する改良された化学特性をもたらすものである。このような技術は、相補にするポリペプチドのアミノ酸配列を組織的に決定することにより、酵素アクセプターと酵素ドナーとの間の会合定数のより正確な制御をもたらすものである。さらに、このような技術は、これらのポリペプチドの低価格で確かな源を産出するものである。

【0061】<u>酵素ドナー:改良されたカップリング化学</u> 特性

本発明の1つの実施態様によると、1つの α - ドナードメインと1つの検体ドメインを有する酵素- ドナーは、 検体を検体ドメインへカップリングさせるための化学特 30 性を改良するために、組換えDNA技術の使用によって 調製される。これらの酵素ドナーポリペプチドは、相補 に必要とされる α - ドナードメイン配列から変化される 距離で、検体の共有結合的付着のための都合のよいカップリング部位を提供する。

【0062】1つの検体カップリングドメインを含有するタイプの酵素ドナーポリペプチドを得るために、当業者に公知であるプラスミド pUC13(図2A参照)が、種々の酵素を用いて α - 領域中の異なる部位で開裂され得る。例えば、HaeII、BgII、MstIあるいは 40 PvuIでの開裂は、H-シリーズ、B-シリーズ、M-シリーズはよびP-シリーズ α - 領域をそれぞれ生じる。B-シリーズおよびH-シリーズはT4 DNAポリメラーゼおよびS1ヌクレアーゼで処理される。M-シリーズとP-シリーズは処理されない。DNAのそれぞれのシリーズは、多重クローニング部位においてSacIで消化され、そして α - 相補ペプチドをコードする小さなDNAはアガロースゲル精製により精製され、DEAE- セルロース紙上に電気泳動され、溶出されそしてエタノール沈澱される。

【0063】さらに、プラスミドを遺伝子操作し、温度誘発性プロモーター[temperature inducible promoter] の調節[regulatory control] 下に α - ドナー配列を置く。これは、温度感応性であり、タンパク質発現の温度誘発を準備する1つの λ リプレッサータンパク質(λ C I 遺伝子によってコードされた)と組合せて、1つの λ Pr プロモーターを用いて達成され得る。 λ 変異体遺伝子CI857は、37℃より高い温度で不活性である温度感応性リプレッサータンパク質に関してコードするものである。以下、 λ CI遺伝子に関するものはCI857変異体遺伝子と言及する。

【0064】本発明の他の実施態様によると、1つのα - ドナードメインと1つの検体ドメインを有する酵素ド ナーは、検体を検体ドメインにカップリングするための 化学特性を改良するために、化学的ポリペプチド合成技 術の使用によって調製される。これらの酵素ドナーポリ ペプチドは、相補に必要とされるα-ドナードメイン配 列から変化される距離で、検体の共有結合的付着のため の都合のよいカップリング部位を提供する。化学的ポリ ペプチド合成技術はまた、α-ドメインおよびタンパク 質ドメインからなる酵素ドナーを調製するために用いら れ得る。酵素ドナーペプチドは、標準合成技術によって 自動化ペプチド合成器において合成される。簡単に述べ ると、所望のペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を表わ す保護されたアミノ酸が架橋ポリスチレンビーズに付着 される。この樹脂ビーズは、付加的なアミノ酸が、段階 的様式においてカップリングされ得る固相として機能す る。ペプチドは、カルボキシ末端からN-末端へ連続的に 鎖を成長させることによって生成される。固相は、反応 を迅速に100%完了に導くことを、過剰な試薬を用い ることによって容易とする。過剰な試薬は、次に容易に 洗浄除去され得る。合成段階の完了時に、ペプチドは樹 脂より除去されそして精製される。

【0065】本発明の方法により調製される酵素ドナーペプチドは、CNBr2/M15、CNBr/M112 およびCNBr24/X90相補系の従来のポリペプチドより、検体に対する付着に関する優れたカップリング 化学特性を有するものである。

【0066】多くのアミノ、カルボキシルおよびスルフヒドリル基を有するM15への検体のカップリングは、すべての場合において(十分に制御された条件においてすら)、M15を不活性とした。動力学実験は、活性を不活性とするのに十分である単一ヒットを示している。同様の結果がM119およびX90でも期待されるものであった。

【0067】試験されたすべての場合において、N H₂、COOHおよびSH基を介してCNBr2ペプチ ドへの検体の共有結合的付着は、相補し得ないポリペプ チドをもたらしたCNBr2は、内部のリシンを含んで おらず(有効なNH₂基がない)、1つの非反復のスル

フヒドリル基および数個のカルボキシル酸基を含んでい る。最初に、ラングレーとの一致 ("β-ガラクトシダ ーゼ α- 相補性の分子状態"と題された工学博士論 文, UCLA, 1975年) において、N-末端α-アミノ基への カップリングは、CNBr2の相補活性を不活化するこ とが示されている。一連の実験において、異なる分子量 の化合物のいくつかが、CNBr2ペプチドのN-末端に 位置する単一アミノ基に共有結合的に付着した。以下の 化合物は、このペプチドのN-末端アミノ基と反応した: 無水コハク酸 (MW100ダルトン);ビオチン-N- ヒ 10 ドロキシスクシンイミド エステル (MW342ダルト ン) ; 4-フェニルスピロ [フラン-2(3HO, -1'-フタロ ン] -3,3'-ジオン (フルオレサミン) (MW278ダル トン);およびジクロロトリアジニルアミノフルオロセ イン- ジヒドロクロライド (MW568ダルトン)。こ れらの酵素ドナー結合体による相補は、遊離CNBr2 ペプチドによる相補と比較された。M15あるいはEA 23酵素アクセプターのいずれかを相補するCNBr2 の能力は、付着した化合物によってそれぞれ約25%、 39%、46%および63%阻害された。組み換えDN 20 A技術によって調製された酵素ドナーポリペプチドのN-末端アミノ基へのこれらの同様の化合物の類似の共有結 合的付着は、相補を同様に阻害したことに注意すべきで ある。これゆえ、検体、特に約500ダルトンより大き な分子量の検体のN-末端のアミノ基へのカップリング は、酵素- ドナーポリペプチドによる相補をかなり制限 するものである。

【0068】第二に、精製されたCNBr2ペプチドに おいては、検体の共有結合的付着のために有効な遊離ス ルフヒドリル基がない。CNBr2の調製 (ラングレ ー,フォウラーおよびゼビン,1975年,ジェイ.バイオ ル. ケム. 250: 2587 [Langley, Fowler and Zabin, 197 5, J. Biol. Chem. <u>250</u>:2587]) において、第76位のス ルフヒドリルは、臭化シアンによる開裂に先だち、還元 されそしてヨード酢酸でアルキル化される。このスルフ ヒドリルがアルキル化されないとすると、CNBr2活 性は、精製の段階の初期には維持され得るが、均質性へ の精製の前に失われる。また、このスルフヒドリルがヨ ード酢酸の代わりに検体のマレイミド誘導体でアルキル 化されるとすると、結合体の不溶性が精製をさまたげ る。

【0069】第三に、試験されたすべての場合におい て、CNBr2のCOOH部分へのカップリングは相補 性活性を不活性とした。例えば、テオフィリン-8- プロ ピルアミンが、水溶性カルボジイミド1-エチル-3-(3-ジ メチル- アミノプロピル) カルボジイミド (EDAC, シグ マケミカル カンパニー[Sigma Chemical Co.]、ミズー リー州セントルイス)を用いて、テオフィリンをCNB r2にカップリングする試みにおいて用いられた。テオ フィリン-8- プロブチレートが、クックら[Cooket al.] 50 のこのような反応性基を有していない場合、検体の誘導

(1976年, レス. コム. ケム. パス. ファラム. 13:497 ~505[1976, Res. Comm. Chem. Path. Pharm. <u>13</u>:497-505]) に従い合成され、そして修正されたカーティウス[Curti us] 転位 (ウォッシュボーンとペーターソン、シンステ ィク コム. 1972年, 2 (4) : 227 ~230 [Wash-borne a nd Peterson, Synthetic Comm. 1972, 2 (4) :227-230]) (2 よってテオフィリン-8- プロピルアミンに転化された。 精製された生成物の構造は、デューク ユニヴァーシテ ィ[Duke University] でティー、バナマン博士[Dr. T. Va naman]によって質量分析学により確認された。 O. 1M Na PO4、 pH7. 4の0. 5ml中のCNB r 2の2 ×10⁻¹¹ mol とテオフィリン-8- プロピルアミンの1 ×10⁻⁵mol を含む数本の試験管に対し、EDACの減 少量が添加された。得られた相補活性は、酵素-アクセ プターとしてのM15および基質としてのo-ニトロフェ $-\mu - \beta - D - ガラクトピラノシドを有する0.5M P$ M2緩衝液[PM2 Buffer]中において測定された。EDA Cは使用の直前に溶解され、冷水中に希釈され、種々の 希釈の10μlが反応管中に添加された。1.403; 0. 000; 0. 000; 0. 010; 0. 018; 0. 125;および0. 983の光学濃度 (414nm) がそれぞれ、 $0;1\times10^{-6};1\times10^{-7};1\times1$ 0^{-8} ; 1×10^{-9} ; 1×10^{-10} ; 1×10^{-11} モルの EDACの濃度を用いて計測された。これらのデータは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミ ドとのカップリングを試みられたCNBr2の迅速な不 活性化を示すものである。

【0070】これに対して、本発明により調製される酵 素- ドナーポリペプチドは、N-末端より十分に離れたス ルフヒドリル、アミノあるいはカルボキシル基を、酵素 ドナー結合体の触媒的に活性な酵素複合体を酵素アクセ プターと形成する能力による干渉なく検体がこれらの基 に共有結合的に付着されるように、提供するために、遺 伝子操作されるあるいは化学的に合成される。スルフヒ ドリルおよびアミノ基が好ましいものである。

【0071】遊離スルフヒドリルが存在する場合、それ は検体上に存在する反応性基と反応し得る。このような 反応性基としては、反応性ハロアルキル基および酸/ハ ロ基、p-メルクリベンゾエート基ならびにミカエル型付 40 加反応[Michael-type addition reaction] し得る基(例 えば、マレイミドや,ミトラルとラウトン,1979年,ジ ェイ. アメル. ケム. ソシ. 101:3097~3110[Mitral and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110] (おいて述べられたタイプの基などを含む) などが含まれ るが、もちろんこれらに限定されるわけではない。本明 細書において定義されるように、ハロアルキルは、臭 素、ヨウ素、あるいは塩素で置換された1~3個の炭素 原子の任意のアルキル基からなる。検体が、酵素ドナー の遊離スルフヒドリル基に対してカップリングするため

30

24

体が、このような反応性基を含むように調製され得る。 【0072】<u>酵素- ドナー:融合タンパク質</u>

本発明の他の実施態様によると、酵素ドナーポリペプチ ドは、α-ドナードメインをコード化する遺伝子を、検 定されるべきタンパク質検体(あるいはその一部)をコ ード化する他の遺伝子と、連結する[ligating]あるいは 融合することにより調製される。適当な宿主細胞におけ る連結された遺伝子の発現は、酵素アクセプターとの相 補および検体結合タンパク質への特異的結合のいずれを もなし得る融合タンパク質産物をもたらす。これゆえ、 本発明のこの実施態様により調製された融合タンパク質 は、いずれも融合された遺伝子によりコード化された、 2つのドメイン、すなわち(1) α - ドナードメインと (2) タンパク質ドメインとから成るものである。先に述 べたように、本発明において利用されるタンパク質ドメ インは、タンパク質抗原の免疫反応性エピトープからな るものである。

【0073】融合タンパク質をコード化する遺伝子を構 築する[construct] ために、問題の2つの遺伝子は、翻 訳解読枠が維持されかつ終止コドンによって不断とされ 20 るように、これらのコーディング配列と連接されなけれ ばならない。さらに、宿主がリプレッサーを含む株であ る場合、融合タンパク質は、誘導のリプレッサーの不活 性化に対する応答してのみ産出される。融合タンパク質 は、相補性活性に関して、酵素アクセプターの生体内相 補 [in vivo complementation] によって同定される。 免疫反応性およびタンパク質ドメインとの抗体の相互作 用による相補の免疫特異性阻害に関する遺伝的構造物の スクリーニングは、試験管内的に [invitro] 行なわれ る。

【0074】融合タンパク質は、免疫反応性ポリペプチ ドがα- ドナードメインのN-末端にあるいは酵素- ドナ ーポリペプチドのC-末端に付着されることで構築される ことができる (図4~6参照)。 α - ドナードメインと タンパク質ドメインの間のスペーサー配列は、相補性を 高めるあるいは、相補における特異的結合タンパク質と の相互作用の阻害効果を高めるために用いられ得る。

【0075】さらに、特定のタンパク質検体に関してコ ードする完全遺伝子の融合は、必要とされないものであ る。例えば、関連ヒト糖タンパク質ルトロピン[leutrop 40] in] (黄体化ホルモン;LH) 、フォリトロピン[follitr opin](卵胞刺激ホルモン; FSH)、チロトロピン(甲 状腺刺激ホルモン; TSH) およびヒド絨毛性ゴナドト ロピン(hCG) はαおよびβ- サブユニットからなる。 これらすべてのホルモンの α- サブユニットは同一のも のである。しかしながらそれぞれの場合において、 β -サブユニットは異なっており、そしてそれぞれのホルモ ンの独特の特異性および生物学的活性を与えるものであ る。これゆえ、β-サブユニットのみが、このグループ の特定のホルモンに関して特異的な免疫検定法を構成す 50 るために、α-ドナードメイン配列に融合される必要が あるであろう。

【0076】あるいはまた、α- ドナーをコードする遺 伝子配列に融合されるタンパク質ドメインに関しコード する免疫反応性配列は、非反復の免疫反応性エピトープ で表わされ得る。例えば hCGのβ-サブユニットの独 特なカルボキシ末端30アミノ酸延長(ビルケンら、19 82年, エンドクリノロジイ_110:1555[Birken et al.,1 982, Endocrinology <u>110</u>: 1555])が hCGに関する検定 においてタンパク質ドメインとして用いられ得る。

【0077】その他の例示的実施例によると、完全B型 肝炎ウィルス表面抗原に関する配列あるいはこの配列の ほんの小さな部分が、B型肝炎ウィルスに関する免疫反 応性エピトープとして用いられることができた (レーナ ーら,1981年,プロク.ナトル.アカド.サイ.ユーエ スエイ <u>78</u>: 3403[Lernere et al., 1981, Proc. Natl. Aca d. Soc. USA <u>78</u>:3403]) 。

【0078】酵素ドナーは、市販のDNA合成器および 同様なものを用いるDNAの直接合成を含む組換えDN A技術を包含する種々の方法によって調製されることが できる。

【0079】<u>酵素アクセプター</u>

先に述べたように、酵素ドナーと酵素アクセプターポリ ペプチドとの間の会合の定数は、任意の酵素相補性検定 系で満足な感受性を達成するための重要なパラメーター である。本発明によると、酵素ドナーと酵素アクセプタ ーとの間の会合の定数を調整するために、酵素ドナー α - ドメイン (上記、「酵素ドナー」参照) あるいは酵素 アクセプターのいずれかのアミノ酸配列が組織的に変え られる。

【0080】酵素ドナーに対して変更された親和性を有 する酵素アクセプターは、欠失体構築あるいは、所望の アミノ酸配列を有するDNAの直接合成後の天然のβ-ガラクトシダーゼをコード化するlac Z遺伝子のα- 領 域のDNA配列中への枠内における連結を含む(もちろ んこれらに限定されるものではない。) 種々の組換えD NA技術を用いて調製される。

【0081】欠失体構築による酵素アクセプターの調製 に関する例示的技術は、下記において詳細に表わされ る。非常に簡単にのべると欠失体構築技術は、β-ガラ クトシダーゼ Ζ 遺伝子の α- 領域中への特定の制限酵素 に関して特異的な部位の導入した後、例えばBal31消 化のような部位特異的消化をし所望のアミノ酸配列を得 ることを含むものである。適当な制限酵素での消化の後 に、生存可能な酵素アクセプターは、生体内相補能を用 いて単離される。例えば、相補は、関心の酵素ドナーな らびに酵素アクセプターに関しコードする温度誘発性遺 伝子を持つプラスミドを、AMA1004 (AMA10 04は、galU, galK, StrA*, hsdR-, leuB 6, $\underline{\operatorname{trp}}$ C, \triangle ($\underline{\operatorname{lac}}$ I POZ) C 2 9 である。) (カ

サダバンら、1983年、メソッズインエンザイ←モロジイ [Casadaban et al.,1983,Methods in Enzymology_100:2 93]) のような株中に形質転換し、そして誘導物質イソプロピルチオガラクトシドおよび色素産生性基質5-ブロモー4ー クロロー3ー インドリルー β -Dー ガラクトピラノシドを含むプレートにおいて選択することによってスクリーニングされ得る。 30 では白色であるが 42 では背色のコロニーは、生存可能な酵素アクセプターの産生を示す。このような酵素アクセプターからのDNAはSal Iで切断され、再連結されそしてAMA 1004 中へ形 10 質転換される。酵素アクセプターポリペプチドは次に精製される。

【0082】あるいはまた、酵素- アクセプターは、任意の市販のDNA合成器を用いるDNAの直接合成によって調製され得る。所望の合成DNA配列は、次にアニーリングされそして適当なプラスミドベクター中へ連結される。例えば、プラスミドp150はBamHIおよびXhoI制限酵素で消化される。所望の合成DNA配列は次にBamHI/XhoIギャップ中に挿入される。

【0083】本発明の他の実施態様によると、安定性が向上した酵素アクセプターが、酵素相補性検定における使用のために調製される。酵素アクセプターの不安定性は、酸化状態によって最も顕著に影響される。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)および2-メルカプトエタノールもしくはジチオトレイトールのような還元剤は、酵素アクセプターの安定性を劇的に改良する。これらの結果は、不安定性の原因としての酵素アクセプターにおける曝れたスルフヒドリル基を指すものである。ジョルンヴォール、ウォウラおよびゼアビン(バイオケミストリー、1978年、17:5160~5164[Biochemistry、1978 17:5160~5164])によると、天然 β - ガラクトシダーゼの単量体ポリペプチド鎖の16のシステイン残基の2つが酵

素の表面上に位置される。しかしながら、酵素-アクセ プターM15は、表面上に5つのシステイン残基を含 む。これゆえ酵素アクセプターの安定性を改良するため に、曝されたシステイン残基は、下記において述べられ る改良された酵素-アクセプターから組織的に除去され る。酵素アクセプターをコード化する遺伝子は、適当な M13バクテリオファージ中にクローニングされ、一本 鎖DNAが単離されそしてザ アプライド バイオシス テムズ インコーポレーション[the Applied Biosystem s, Inc.] DNA合成器において合成された適当なオリゴ ヌクレオチドプライマーにアニーリングされた。 ゾラー とスミス[Zoller and Smith] (メソッズ イン エンザ イモロジイ 1983, <u>100</u>, 468~500 , アカデミック プレス[Methods in Enzymology 1983, 100, 468-500, Ac ademicPress]) によって述べられるような標準的方法が これらの構築において用いられる。

【0084】 検体

本発明の改良された方法および新規な組成物は、薬剤、薬剤代謝産物、生物学的活性分子、ステロイド、ビタミン、産業汚染物、農薬およびそれらの代謝産物、食品添加物、除草剤およびそれらの代謝産物、風味剤および食品毒、病原体およびこれらの産生する毒素、ならびにその他の関心物質を含む種々の検体の存在および/または量を測定するために用いられることができる。例えば、約2,000ダルトンより大きな分子量を有するタンパク質のような、比較的高分子量の検体が、より小さな検体と同様に、本発明の改良された検定法および組成物を用いて検知および/または測定され得る。このような検体の例示的な例としては、表1に示されるようなものが30 含まれるが、これらに限定されるわけではない。

[0085]

【表1】

分子量 髙

癌胚抗原

. 1

フェリチン

ヒトT細胞白血病ウィルス

インスリン

αー胎児タンパク質

風疹ウィルス

ヘルペスウィルス

サイトメガロウィルス

卵胞成熟ホルモン

甲状腺刺激ホルモン

黄体化ホルモン

肝炎ウィルス

絨毛性ゴナドトロピン

卵胞ホルモンレセプター

甲状腺刺激ホルモンレセプター

ポリオウィルスレセプター

インスリン輸送タンパク質

プロテインA

コンカナバリンAレクチン

小麦胚凝集素レクチン

分泌タンパク質

コレラ毒素

アビジン

低分子量

エストリオール

ジゴキシン

チロキシン

プロプラノロール

メトトレキセート

フェンシリジン

メサドン

モルヒネ

ジアゼバム

オキサゼパム

キニジン

プロポキシフェン

N-アセチルプロカインアミド

セコバルビタール

トプラマイシン

ゲンタマイシン

テオフィリン

アンフェタミン

ベンソイルエクゴニン

フェニトイン

プロカインアミド

ライドカイン

カルバマゼピン

プリミドン

バルプロイックエシッド

フェノバルビタール

エトスクシンイミド

ビオチン

【0086】酵素基質

本発明による改良された酵素検定法において、試料混合 物中の未知検体の量はβ- ガラクトシダーゼ酵素の活性 の正比例関数として測定される。酵素活性は、酵素的に 触媒された反応の産物の出現によってあるいは、酵素基 質の消失によって監視される。これは、基質の転化率で ある。分光測光的あるいは螢光定量的検定に適したβ-ニル- β-D- ガラクトピラノシド;2'-N-(ヘキシデカノ ール) -N-(アミノ-4'-ニトロフェニル)-β-D- ガラクト ピラノシド;4-メチルウンベル- リフェリル -β-D- ガ ラクトピラノシド:ナフチル-AS-B1- β-D- ガラクトピ ラノシド;1-ナフチル -β-D- ガラクトピラノシド;2-ナフチル - β-D- ガラクトピラノシドモノハイドレー ト;o-ニトロフェニル - β -D- ガラクトピラノシド;m-ニトロフェニル -β-D- ガラクトピラノシド;p-ニトロ フェニル -β-D- ガラクトピラノシド;ならびにフェニ - インドリル -β-D- ガラクトピラノシド, レソルフィ ン -β-D- ガラクトピラノシド、7-ヒドロキシ-4- トリ フルオロメチルクマリン, ω-ニトロスチリル -β-D-ガラクトピラノシド, およびフルオレセイン -β-D- ガ ラクトピラノシドなどが含まれるが、もちろんこれらに 限定されるわけではない。

【0087】検体結合タンパク質

ガラクトシダーゼに関する基質としては、p-アミノフェ 40 本発明による酵素検定法は、遊離検体と酵素ドナー結合 体との間の検体結合タンパク質に対する競合的相互作用 を利用するものである。酵素ドナー結合体の相互作用 は、相補反応を阻害する。下記の実施例7および8にお いて詳細に述べられるように、検体結合タンパク質に対 して特異的な抗体あるいは抗体フラグメントの付着は、 立体障害効果を高めるのに有用であり、そしてこれゆえ 検体結合タンパク質に結合した酵素ドナー結合体による 相補の阻害に寄与する。

【0088】本発明の1つの実施態様によると、検体結 ル -β-D- ガラクトピラノシド, 5-ブロモ-4- クロロ-3 50 合タンパク質は、1 つの抗体分子である。このような場 合においては、検定は、酵素免疫検定である。このような検定に有用な抗体分子としては、測定されるべき検体に対して特異的な従来の(多クローン性の)および単クローン性の抗体(ならびに多クローン性および単クローン性抗体のフラグメント)の双方が含まれる。

【0089】本発明の他の実施態様によると、検体結合 タンパク質は、ビオチンに対して特異的親和性を有する アビジンである。このような場合においては、酵素検定 は、ビオチンのみならず、アビジンに対する親和性を保 持するビオチンの誘導体を測定するのに有用である。

【0090】本発明の他の実施態様によると、検体結合 タンパク質は、レセプター、レクチン、輸送タンパク質 などを含む(しかしながらこれらに限定されるわけでは ない。)結合タンパク質である。

[0091]

【実施例】以下、実施例によって本発明をさらに具体的 に説明する。

【0092】<u>実施例1:組み換え方法による酵素ドナー</u> および酵素アクセプターの調製

以下のすべての実験において、すべてのDNA制限およ 20 び修飾酵素は、ニューイングランド バイオラブス[New England Biolabs] (マサチューセッツ州ベバリー) から 得られ、そして製造業者の指示に従って用いられた。

【0093】1. 酵素ドナー

1. 1. p125酵素ドナー

プラスミド p125を遺伝子操作し、温度誘発性プロモーター(λ Pr)の調節下に α - ドナー配列を置いた。さらに、発現した α - ドナーペプチドは、C-末端近くにシステイン残基を含むものである。これは、プラスミド pUC13をBgl I で開裂することにより達成され、そ 30 して得られた一本鎖末端はS1ヌクレアーゼでの処理により除去された。プラスミドは次にBamHIで消化された。 β -ガラクトシダーゼ α - 遺伝子をコード化する約170bpのDNAフラグメントが次にアガロースゲル電気泳動法によって精製された(図2参照)。

【0094】プラスミド $p\beta$ gal 2は、温度誘発性 Prプロモーターの調節下に \underline{lac} π π \underline{lac} π π \underline{lac} π π \underline{lac} \underline{lac}

めに<u>Bam</u>H I および<u>Sal</u> I で開裂された。これらのDN Aフラグメントは、 pβgal 2から単離されたBamHI /Sal I フラグメントに連結された。得られたプラスミ ドである p121Bは、ベクターのBamHIとSalIの 間に<u>Eco</u>RIおよび<u>Xba</u>I認識部位を含んでいる。プラ スミド p121BはBamHIおよびPvuIIで消化され た。 β - ラクタマーゼ遺伝子(アンピシリン耐性amp * を授与するものである。)、ファージλCI遺伝子 (温 度制御されたリプレッサー) および複製のプラスミド起 10 点(ori) を含むBamHI/PvuIIDNAフラグメント がアガロースゲル電気泳動により精製された。 pUC1 3からのBgl I (-) /BamHI DNAフラグメント と p121Bからの<u>Bam</u>HI/<u>Pvu</u>II DNAフラグ メントが図2Bに示されるようにT4 DNAリガーゼ を用いて連結された。この組換え型プラスミドは、一本 鎖ファージΜ13およびその組換え体 (β- ガラクトシ ダーゼ変異体ポリペプチドM15をコード化するもので ある) の成長に関するエシェリキア・コリ細菌性宿主の 1つである J M 8 3 (メッシング, 1979年, レコンビナ ント DNA テクニカル ビュレッチン, NIH パ ブリケーション No.79~99, <u>2</u>, No.2:43~48[Messin g, 1979, Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publ ication No,79-99,2,No. 2:43-48]) 中に形質転換さ れ、そしてプラスミド p125が選択された。生体内相 補が42℃では起こるが32℃では起こらず、プラスミ ド p125が温度誘発性β-ガラクトシダーゼα-タン パク質を産生することが示された。

【0095】<u>1.2.H、B、MおよびPシリーズ酵素</u> ドナー

一連の実験において、検体カップリングドメインを含む ·タイプの酵素ドナーペプチドを得るために、 (上記「酵 素ドナー:改良されたカップリング化学特性」参照)種 々の大きさのα- 領域が、Hqe I I、Bgl I、Mst I あ るいはPvuIで消化されたpUC13 (ビェイラとメッ シング, 1982年, ジーン <u>19</u>:259 ~268 ; メッシン グ, 1983年, メソッズインエンザイモロジイ<u>101:20</u>-78; ベセスダ リサーチ ラボラトリーズ, メリーラン ド州ガイゼルスバーグ[Vieira andMessing, 1982, Gene 1 9:259-268; Messing, 1983, Methods in Enzymorogy 10 1:20-78; Bethesda Reseach Laboratories, Gaithers-be rg, MD])から単離され、それぞれH-シリーズ、B-シリー ズ、M-シリーズおよびP-シリーズをもたらした。B-シリ ーズ、P-シリーズおよびH-シリーズはT4 DNAポリ メラーゼおよびS1ヌクレアーゼで処理された。M-シリ ーズは処理されなかった。それぞれのシリーズのDNA は、多重クローニング部位に位置するSac I で消化さ れ、そしてα- 相補ペプチドをコード化する小さなDN A群は、製造業者によって述べられるように、アガロー スゲル精製によって精製され、DEAE- セルロース紙 (シュレイサー アンド シューレル[Schleicher and

Schuel1]、ニューハンプシャー州ケーン)上に電気泳動 され、溶出されそしてエタノール沈澱された。

[0096] pBR322 \mathcal{O} 2. 3kb <u>Eco</u>RI-<u>Pvu</u> IIフラグメント中にクローニングされたエシェリキア ・コリ<u>trp</u>プロモーター (EcoRI-SstI、120b p) を有するプラスミド p141 が Nde I で消化され、 そしてDNAポリメラーゼクレノウ[Klenow]フラグメン トならびに dATPおよび dTTP (ピーエル バイオ ケミカルズ[PL Biochemicals] ウィスコンシン州ミルウ ォーキー) で処理された。得られたDNAはSacIで消 10 化され、そして、M, B, HおよびPシリーズのDNA を受けるためのベクターとして用いられた。T4 DN Aリガーゼでの処置に続き、DNAはエシェリキア・コ リ株E9001 (Δlac pro, thi, SupE, F pr o_AB, lac I 9, Z M15, 株71. 18とも呼ば れる;メッシングら,1977年,プロク.ナトル.アカ ド. サイ. ユーエスエイ 75; 3642~3646[Messinget a 1.,1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>75</u>; 3642-3646]) 中 に形質転換された。これらのDNA構築物は、マキサム とギルバート[Maxam and Gilbert] の方法 (1980年, メ ソッズ インエンザイモロジイ 67:499[1980, Methods in Enzymology 67:499])によって配列決定され、そし て図4および5に示される。また、(*)で表わされる ものは、検体の共有結合的付着のための部位である。

【0097】エシェリキア・コリ株E9001における Trp制御下にα-領域をコード化する得られた株は、B シリーズに関しては、プラスミド p130を有する株M G130、Mシリーズに関してはプラスミド p129を 有する株MG129、またHシリーズに関してはプラス ミド p131を有する株MG131であった。

【0098】異なるクローン化α- 領域の発現レベルを 改良するために、α-領域は新たなプラミドへ移入さ れ、そしてλ Pr オペレーター -プロモーターの制御下 におかれた。例えばMG141を作製するために、H-シ リーズからのH6のDNA配列をコード化する遺伝子 が、以下に述べるように APr および ACI 遺伝子のT rpプロモーターの置き換えによって、Pr 制御下に置か れた。

【0099】Trpオペレーター -プロモーター制御下に H6を含むプラスミド p131は、EcoRIで消化さ れ、そして大きな方の約2.1kbフラグメントがアガロ ースゲル電気泳動法によって単離された。 λ Pr および λCI遺伝子は、 p125のEcoRI消化の小さなフラ グメントからゲル精製された。 p131の2. 1kbフラ グメントは、 p125からの小さなフラグメントに連結 され、事実上Trpプロモーターを l Pr および l C I プ ロモーター系と置き換えた。この処方が λ Pr 制御下の 以下のプラスミドおよび菌株、すなわちBシリーズに関 しては、プラスミド p139を有する株MG139; M シリーズに関してはプラスミド p140を有する株MG

140;およびHシリーズに関してはプラスミド p14 1を有する株MG141を得るために、 p130および p129を用いて繰返された。DNA構造は、マキサム とギルバート, メソッズ イン エンザイモノジイ 6 $\underline{7}:49(1980)$ [Maxam and Gilbert, Methods in Enzymolog y <u>67</u>:499(1980)]の方法によって配列決定され、そし て図4および5に示される。

【0100】1.3.p148酵素ドナー

p125からのλ Pr 配列を利用して、新たなプラスミ ドが、ペプチドのN-末端側にシステイン残基を与えるた めに、作製された。この新たなプラスミドである p14 8はまた、ペプチドのC-末端近くに位置した3つのシス テイン残基を含んでいるものであった。プラスミド p1 25が<u>Bam</u>H I および<u>Eco</u>R I で消化され、約1000 bpのフラグメントが、該ベクターより切り出され、そし てアガロースゲル電気泳動により精製された。このフラ グメントは APr 配列を含むものであり、これは、 pU C12の唯一のBamHI/EcoRI制限部位中に連結さ れた (メッシング、1983年、メソッズ イン エンザイ モロジイ 101:20~78[Messing, 1983, Methods in Enz ymology <u>101</u>:20-78])。この組換え型プラスミドは J M83細胞中に形質転換され、そして上記に述べた p1 25の作製と同一の様式において42℃で生体内的に相 補することが見出された。酵素- ドナー p148の構造 はまた図6に示され、これは検体の付着に関して本発明 により利用されるものであるアミノおよびスルフヒドリ ル基カップリング部位の位置を含むものである。

【0101】1.4.酵素-ドナー3

酵素- ドナー3 (ED3) は、H6から作製された酵素 30 - ドナー1 (ED1) から作製された。ED1は以下の ようにして作製された。

【0102】DNAフラグメントの合成は、アプライド バイオシステム、インコーポレーテッド (エイビーア イ,カリフォルニア州フォスターシティー)モデル38 OADNAシンセサイザー[Applied Biosystems, Inc. (A BI, Foster City, CA) Model380A DNA Synthesizer]にお いて行なわれた。それぞれの配列は、プログラムメモリ 一中に入力され、そして機械は、所望の一本鎖DNAを 自動的に製造し、孔径制御ガラス支持体からそれぞれの フラグメントを開裂し、そしてバイアル (小瓶) 中にD NAを集めた。DNA試料は、濃縮NH4 OH1. 5ml で6~24時間、55℃で処理され、そしてサバント スピード ヴァク コンセントレーター[Savant Speed Vac Concentrator] 中で乾燥状態とされた。

【0103】それぞれのDNAフラグメントの乾燥ペレ ットは、ホルムアミドの微量 (100~200μ1) に 溶解され、そして12%アクリルアミドゲル (BRL Model SO, 30~40cm, 厚さ1.6mm) 上に精製 され、そして200ボルトで一晩電気泳動された。所望 のバンドが、螢光バックグラウンドとしてベーカー -フ

レックス シリカゲル IB-F (ジェイ ティー ベ ーカー ケミカルカンパニー) [Baker-flex sillica ge 1 1B-F(J. T. BakerChemical Co.] を用いて視識化され た。所望のDNAバンドは、カミソリ刃を用いてゲルよ り切り出され、そして該DNAは、インターナショナル バイオテクノロジーズインコーポレーテッド (IB I) モデル UEA ユニット[International Biotech nologies Inc. (IBI)Model UEA unit] において製造業者 の指示に従いポリアクリルアミドゲル断片から電気泳動 された。DNAは、微量の緩衝液中に集められ、そして 10 エタノール沈澱された。該フラグメントは、製造業者の 指示に従いT4 ポリヌクレオチド キナーゼで処理さ れた。相補的DNA鎖が組合され、2分間90℃に加熱 され、そして室温に徐冷された。アニーリングされたD NAは、ハイブリッド (交雑) されていない鎖を除去す るためにアガロースゲル電気泳動によって精製され、そ して連結反応に用いられた。

【0105】ED1の新たなN-末端コーディング領域は、アプライドバイオシステム インコーポレーテッドの機械によって合成された75bp DNAフラグメントであった(図16参照)。新たなC-末端コーディング領域である50bpDNAフラグメントが、また合成された(図16参照)。この2つの新たなDNAフラグメントが、小さなEcoRI-BalI H6 DNAフラグメントに連結された。この混合物は、約275bpの新たなED遺伝子を得るために、BamHIおよびSalIで切断された。このDNAの断片は、ゲル精製されそしてベタクーBamHI-SalI DNAフラグメント中に連結された。

【0106】ED1配列を確認した後に、このプラスミド (p181、図17を参照のこと)は、 \underline{Bam} HIと \underline{E} \underline{co} RIで切断され、75bp ED1 N-末端が除去された。この領域は、 \underline{Bam} HI- \underline{E} \underline{co} RIスペース中に置換された30bpの新たな合成フラグメント(図16参照の

こと。)によって置き換えられた。

【0107】これゆえED3は、ED1より15アミノ酸短いものであり、そのN-末端近くにシステイン残基を有する。ED1は、その配列中にシステインあるいはリシンのいずれも有しない。図18はED3のアミノ酸配列を画くものである。

酵素ドナー3A (ED3A) のアミノ酸配列は図18に

【0108】<u>1.5.酵素ドナー 3A</u>

示される。該ペプチドは、ベックマン(カリフォルニア 州パロ アルト) 990B ペプチド シンセサイザー [Beckman (Palo Alto, CA) 990B Peptide Synthesizer] において合成される。合成方法はステワートとヤング「S tewart and Young](ソリッド フェーズペプチド シン セシス, 176pp, ペース ケミカル カンパニー, イ リノイ州ロックフォード, 1984年[Solid Phase Peptide Synthesis, 176bp, Pierce Chemical Co., Rockford, Illi nois, 1984]) によって述べられるようなものである。一 般的な化学薬品は、アルドリッチ[Aldrich] (ウィスコン シン州ミルウォーキー) からのものである。BOC- ア ミノ酸はペニンスーラ ラボラトリーズ[Peninsula Lab oratories](カリフォルニア州ベルモント) からのもの である。側鎖保護は、Boc-Thr (OBzl) 、Boc-C lu (OBzl) 、Boc-Ser (OBzl) 、Boc-Asp (O Bzl) Cys (MeOBzl) Boc-Asn/HOBT Boc-Arg (TOS) およびBoc-His (TOS) であ る。バイオーラッド ラボラトリーズ[Bio Rad Laborat ories] (カリフォルニア州リッチモンド) からのアミノ メチルポリスチレン固相樹脂ビーズは、ステワートとヤ ング (1984年) によって述べられるようにジクロロヘキ 30 シル カルボジイミドを用いてp-ヒドロキシメチルフェ ニル酢酸Boc-Thr (OBzl) にエステル化される。用 いられた合成スケールは、固相樹脂に付着したBoc-T hr 1ミリモルとそれぞれのBoc-アミノ酸3ミリモル である。合成器は次に合成を実行するためにプログラム される。得られたペプチドは、無水フッ化水素酸を用い て樹脂から開裂され、そして酢酸で抽出される。水素添 加に続き、ペプチドは、0.1%TFAおよび0.1% エタンチオールを含む水中に0~80%のアセトニトリ ル濃度勾配でウォーターズ[Waters]フェニルカラムを用 い調製用逆相HPLCによって精製される。部分的に精 製されたペプチドは、lmM NH4HCO3、lmM 2-メルカプトエタノール中に徹底的に透析され、そして凍 結乾燥された。ペプチドのアミノ酸分析は表2に示され る。

[0109]

【表2】

ED3Aのアミノ酸分析

アミノ酸	理論上	検知
ASP (アスパラギン酸)	5	4. 25
THR (トレオニン)	3	2. 13
SER (セリン)	3	2. 39
GLU (グルタミン酸)	5	5. 22
PRO (プロリン)	3	3. 33
GLY (グリシン)	1	0.87
ALA (アラニン)	5	5.65
CYS-PE (システイン-PE)	1	1. 10
VAL (バリン)	3	2. 27
MET (メチオニン)	0	0
ILE (イソロイシン)	1	0.48
LEU (ロイシン)	4	3. 12
TYR (チロシン)	0	0
PHE (フェニルアラニン)	1	1. 16
HIS (ヒスチジン)	1	1.11
TRP (トリプトファン)	2	1.61
LYS (リジン)	0	0
ARG (アルギニン)	5	5.00

分子量は、アミノ酸の平均分子量が114.943で 4942.53である。

【0110】要約すると、図4~6に示されるポリペプチドは、必要とされる α -相補する配列から、変化され 30 た距離に、都合のよいカップリング側鎖を与える。組換え法により作製されたペプチドをコード化するDNA配列は、標準的なマキサムとギルバートの技術によって決定され、予言された構造が確認された。H6のアミノ酸組成は、アミノ酸分析によって確認された。

【0111】1.6. ED酵素ドナーシリーズ EDシリーズと呼ばれる一連の酵素ドナーは、組換えDNA技術を用いて作製された。ED3は、すでに上記1.4において述べられている。このシリーズの他のメンバーには、ED4, ED5, ED7, ED8, ED13, ED15およびED17が含まれる。酵素ドナーのEDシリーズのアミノ酸配列は図19~23に表わされる。

【0112】ED4に関しコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントをアプライド バイオシステムズ、インコーポレーテッド モデル380A DNAシンセサイザーにおいて(上記1.4において述べるように)最初に合成することによって作製された。

[0113]

【化7】

. 50

TGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT

TA ACG GGA AGG GTT GTC AAC GCG TCG GAC TTA

Pvm I

60

GGC CTC GAG TCT AGA TCT GCA GGC ATG (57 mer)
CCG GAG CTC AGA TCT AGA CGT CC (55 mer)
Sph [

【0114】星印でマークされた"T"は、"C"からの変更を表わす。このフラグメントは、プラスミド p181 (ED1) からの \underline{Bam} H I - P vu I 切片に連結された (図17参照のこと。)。得られた切片は、除去された \underline{Bam} H I - \underline{Sph} I 領域を有するベクター (ED1-p181からのもの)中に連結し返された。C (シトシン)の T (チミン)への変更は、システイン (cys)残基を生成し、そして連結の後に \underline{P} vu I 部位を破壊する。(粘着性の[sticky]端部は、連結に関しても同様に維持される。)

ED5に関してコードする遺伝子は、以下の配列のDN 50 Aフラグメントを最初に合成することによって作製され

*【化8】

[0115]

た。

** 40

45

T TGG CGT AAT TGC GAA GAG GCC CGC ACC GAT (31 mer)

A ACC GCA TTA ACG CTT CTC CGG GCG TGG C (29 mer)

Pvu II

Pvu I

【0116】1つの星印でマークされた"T"は、 "C"からの変更を表わす。2つの星印でマークされた "T"は、"A"からの変更を表わす。CのTへの変更は、PvuII部位を破壊する。A(アデニン)のTへの 変更は、セリン残基をシステイン残基へ変更する。この フラグメントは、プラスミド182(ED2ないしはM 15)DNAからのBamHI-PvuII断片およびPvu I-SalI断片に連結された(図17参照のこと。)。 連結された物質は、BamHIおよびSalIで切断され、 BamHI-SalI領域が除去されたプラスミドp182 中に挿入された。

【0117】ED7に関してコードする遺伝子は、 \underline{Eco} R I および \underline{Sal} I の双方を用いて p183 (ED3) お 20 よび p184 (ED4) を切断することにより作製された。p183 からのベクターはゲル精製 (\underline{Eco} R $I-\underline{Sa}$ \underline{I} I (α) 領域を有効に除去する。)された。これに対して、p184 からの小さな \underline{Eco} R $I-\underline{Sal}$ I (α) 領域がゲル精製された。この p184 \underline{Eco} R $I-\underline{Sal}$ I 領域が次に、p183 \underline{Eco} R $I-\underline{Sal}$ I 不分ター中に挿入され、連結された。

【0118】ED8に関してコードする遺伝子は、M13mpllファージDNAにおける部位特異的変異誘発を用いて作られた。プライマーが作製された(配列GGTAACGCAAGGGRTTTCCAAGTC)。このプライマーは、アミノ酸15~22番に関しコードする α - 領域のセンス鎖[sense strand]に相補性である。所望される変更は、M13mpll、DNAの α ※

38

リット形成させ、そしてDNAポリメラーゼ I "クレノ. ウ[Klenow]フラグメント"およびT4DNAリガーゼを 用いて室温にて一晩プライマーを延長させることによっ て達成された。このDNAは、非二本鎖DNAを消去す るためにS1ヌクレアーゼで処理され、次にJM103 細胞に形質転換された。この形質転換からのファージは 単離され、DNAが精製され、そしてプライマー伸長お よび形質転換が合せて3回繰返された。それぞれの反復 は、所望される産物に関して豊かなものとした。最後に ミニ標本分析[mini-prep analysis]が、個々のプラーク からのM13 RFDNAにおいて行なわれた。所望の 塩基変更は、BstNI部位を消失した。BstNIを用い てのミニ標本DNAの制限分析は、候補物を識別した。 所望の変更を担う二本鎖M13 RF DNAから、B amHI-BglI断片が切り出され、そしてED2に関し コードするプラスミドにおけるBamHI-BglI断片と 交換された。

【0119】ED13 (p193、図24参照のこと。) に関しコードする遺伝子は、以下の配列のDNA フラグメントを最初に合成する (上記と同様) ことによって作製された。

[0120]

【化9】

Lys

Bam Bl -3 0 変更 Eco Rl GAT CCC AGC GGC GAT CCC CGG GCA AAA TCG (30 mer)

GG TCG CCG CTA GGG GCC CAT TTT AGC TTA A (30 mer)

【0121】この合成フラグメントは、ED3を作製することに関して上記1.4において述べたと同様にしてp182(ED2)中に置換された。

【0122】ED14(p194、図24参照のこと。)に関してコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントを最初に合成する(上記と同様)ことにより作製された。

[0123]

【化10】

Lys 50 AAA CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT TA TTT GGA AGG GTT GTC AAC GCG TCG GAC TTA Pvu 1

60

GGC CTC GAG TCT AGA TCT GCA GGC ATG (57 mer) CCG GAG CTC AGA TCT AGA CGT GC (55 mer)

Sph 1 Ly 【化11】

[0126]

より作製された。

た。

Pvu II

44 Pvu 1

T TGG CGT AAT AAA GAA GAG GCC CGC ACC GAT (31 mer)

10

A ACC GCA TTA TTT CTT CTC CGG GCG TGG C

【0127】このフラグメントはED5を作製するため に用いたものと同様の方法においてp182 (ED2な いしはM15) 中へ挿入された。

【0128】ED17 (p197、図24参照のこと) に関してコードする遺伝子は、ED7に関しコードする 遺伝子が作製されたものと同様な方法において作製され※ ※たED13およびED14遺伝子の組合せである。

【0129】表3に示されるものは、酵素ドナーのED 20 シリーズと用いられ得る酵素アクセプターの列挙であ る。

40

*【0124】この合成フラグメントは、システイン置換 に代わりリシン残基という結果となる以外は、ED4に

関して用いられたものと同様の術策を用いて作製され

【0125】ED15(p195、図24参照のこと。)

に関してコードする遺伝子は、以下の配列を有するDN Aフラグメントを最初に合成する(上記と同様)ことに

[0130] 【表3】

酵素ドナー 酵素アクセプター * ED3 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED4 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED5 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED7 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED8 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED13 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED14 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED15 M15, EA1, EA14, EA20, EA22 ED17 M15, EA1, EA14, EA20, EA22

その他の酵素アクセプターは試験されていない。

【0131】上記の酵素ドナーと酵素アクセプターの対 のうち、ED5とEA22の組合せが、本発明の相補性 検定法における使用に最も好ましい対である。

【0132】2. 酵素アクセプター

実験の一群において、β- ガラクトシダーゼ遺伝子の枠 内配列欠失のシリーズが、上記実施例1、1. 酵素ドナ ーにおいて述べられた方法により酵素アクセプターのシ リーズを調製するために構築された。 pUC13が、P <u>vu</u> I I (平滑末端[blunt end] を生じる) で消化され、 そしてXho I 制限部位を含む 8 bp合成DNAリンカーに 連結され、新たなプラスミドである pUC13Xが生成 した。

【0133】Xho I制限部位を含むα-領域が次に、天 50 ン, 1983年, ジェイ. モル. アプル. ジェネット. 2:

然β- ガラクトシダーゼをコード化する完全 <u>lac</u> Z 遺伝 子中に lac Z 遺伝子の残余物[remainder] あるいはバッ 40 クグラウンドプラスミドを崩壊することなく置き換えら れた。このZ遺伝子は2つのBgl I 部位を含むものであ る。これらのBgl I 部位の最初のものは、Xho I リンカ ーが挿入された<u>Pvu</u>II部位より下流の pUC13中に おける α- 領域内に含まれる。これゆえ、 pUC13X からのα-領域は、BamHIとBglIでの消化によりプ ラスミドの残余物から除去され、そしてこの170bpフ ラグメントはB1Xと呼称された。

【0134】β-ガラクトシダーゼをコード化する lac Z遺伝子の残余物は、プラスミド pβgal 2 (クイー

1[Queen, 1983, J. Mol. Appl. Genet. 2:1])から得られた。このプラスミドは<u>Bgl</u> I および<u>Eco</u>R I で消化され、そしてZ遺伝子の93%を表わす2つのDNAフラグメントが単離された。それぞれのフラグメントの末端は、この作製において用いられるその他の末端のいずれとも異なるものであった。単離されたフラグメントは、2115bp(以下B2と呼ぶ。)および737bp(以下B3と呼ぶ。)であった。Z遺伝子における<u>Eco</u>R I制限部位は、遺伝子のC-末端近くにある。この末端は<u>Xho</u> I 部位を含む遺伝子が作製される場合、存在すべきであ 10る。

【0135】変異体2遺伝子が pF29中に挿入され た。プラスミド pF29は、EcoRI部位でZ遺伝子の C-末端に融合されたZ遺伝子 α - 領域を含むものであ る。このα-領域は、BamHI部位に挿入されたλPr プロモーターによって制御される。 pF29を作製する ために、2つの中間プラスミド、 pF15および pF1 6が作製された。 pβgal 2がAvaIで消化され、付着 3'末端[cohesive 3' end] がクレノウ フラグメント[K lenow fragment] および4つの dNTPを用いて満たさ れ、平滑末端が生成された。Sal I リンカー (GGTC GACC) (ニューイングランドバイオラブス[New Eng land BioLabs]、マサチューセッツ州ベバレイ)が、T 4 DNAリガーゼを用いて線状化プラスミドに連結さ れた。得られたDNAはEcoRIおよびSalIで消化さ れ、β- ガラクトシダーゼ Z 遺伝子のオメガ (ω) 末端 を表わす300bpDNAフラグメントがアガロースゲル 電気泳動によって精製された。このω- 領域は以下のよ うにしてPr の制御下のα- 領域に融合された。 pUC12 DNA (ベセスダ リサーチ ラボラトリーズ[B 30 ethesda Research Laboratories]、メリーランド州ガイ ゼルスバーグ)がBgl Iで消化され、そしてクレノウフ ラグメントおよび4つの dNTPで処理することによっ て平滑末端が生成された。 EcoRIリンカー (GGAA TTCC) (ニューイングランド バイオラブス、マサ チューセッツ州ベバレイ) がT4 DNAリガーゼを用 いて平滑末端に連結された。このDNAはBamHIおよ びEcoRIで消化され、2-遺伝子のα- 領域を表わす1 80bpフラグメントがアガロースゲル電気泳動によって 精製された。遺伝子フラグメントおよびω- 遺伝子フラ 40 グメントを受け入れるために用いられたベクターは、B amH I およびSal I で消化されそして lacオペロン配列 を除去するためにアガロースゲル電気泳動により精製さ れた p β gal 2であった。該ベクター、 α - 遺伝子フラ グメントおよびω- 遺伝子フラグメントは、T4 DN Aリガーゼを用いて連結し合された。該DNAフラグメ ントの非反復の末端は、これらのフラグメントがクロー ニングされた順序を指図するものである。生成プラスミ ドは pF 15と呼称された。

【0136】pF15は、pF15を<u>Pvu</u>IIで消化す

ることによって生成した平滑末端に連結したSalIJVカーを用いて、非反復のPvuII の位をベクター SalI 部位に転化することによってさらに修飾された。この修飾 pF15 は、次にBamH I およびSalI で消化され、そして最も長いDNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動によって精製されて、 α - ω 遺伝子配列およびSalI 部位とPvuII 部位の間に位置するDNAフラグメントが除去された。修飾されていない pF15 がまた、BamH I およびSalI で消化され α - ω フラグメントが精製された。修飾 pF15 からの大きなフラグメントがこの α - ω フラグメントに連結され、プラスミド pF16 が生成された。

【0137】pF16は、pF15より約1350塩基対だけ小さいものであり、非反復なNdeI部位をSalI部位に極めてより近いものに移動する効果を有する。この巧妙な処置は、その後の作製を通じて担われるものから不必要なDNAを消去する。

【0138】pF29を作製するために、pF16は<u>C1</u> a I およびNde I で消化され、そして A C I 、 A Pr な らびにβ- ガラクトシダーゼのα- およびω- 領域をコ ード化する1400bp DNAフラグメントがアガロー スゲル電気泳動法によって精製された。 pUC13をA cc I およびNde I で消化し、ベクターをアガロースゲル 電気誘導法によって精製した。Acc I およびCla I 制限 部位が同一の付着末端を有し、またNde I 制限部位が同 一の末端を共有するゆえに、 pF16からのDNA挿入 物と pUC13ベクターとの連結は、1回の配向のみで 生起する。T4DNAリガーゼを用いての連結は pF2 9を生成する。 pF 2 9は、1 つの Eco R I 部位を含 み、またCla I 部位を含んでおらず、このことは、第2 のEcoRIおよびClaI部位は、修飾プラスミドの作製 を阻害するであろう (例えば、以下に述べる p149、 および p150から生成される欠失変異体のその後の分 析)ゆえに望ましいものであった。

【0139】pF29はBamHIおよびEcoRIで消化され、間にある α -ドナーが除去され、そしてこのベクターはB1XにB2を加え、さらにB3を加えたもの(B1X+B2+B3)を用いて満たされた。それぞれの断片の非反復な一本鎖末端は、該断片が連結し合い得る順序を定義する。B1X、B2およびB3は、上記に述べたようにBamHIおよびEcoRIで消化された pF29ベクター中に連結され、これにより、 λPr 制御下に、 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4 をコード化する塩基対 γ 5 の2で、 γ 5 が γ 5 に γ 5 が γ 5 に γ 5 に

C13からのFnuDII消化フラグメントが、クレノウ フラグメントを用いて満たされた p149のSal I 部位 中に挿入された。得られたプラスミドは p150と呼称 された。欠失が、 p150をXhoIで消化し、そして次 に該DNAをBal31エキソヌクレアーゼで消化するこ とによって作製された。Bal 3 1 処理の後、プラスミド はT4 DNAリガーゼで連結され、そしてAMA10 04宿主細胞 (AMA1004は、_galU、_galK、_s trA*, hsdR-, leuB6, trpC9830, Δ (lac _IPOZ) である。) C29 (カサバダンら, 1983 年, メソッズ イン エンザイモロジイ 100:293[Casa badan et al., 1983, Methods in Enzymology, 100:293]) 中に形質転換され、そして誘導物質イソプロピル- チオ ガラクトシド (IPTG) および色素産生性基質5-ブロ モ-4- クロロ-3- インドリル -β-D- ガラクトピラノシ ド (Xgal 、シグマケミカル カンパニー、ミズーリー 州セントルイス)を含むルリア - ベルタニ[luria-Berta ni] プレート上でスクリーニングされた。30℃では白 色だが42℃では骨色のコロニーは、生存可能な酵素-アクセプターの生成を示した。コロニーが選択され、プ 20 ラスミドDNAが調製された。プラスミドDNAは、α- ドナーを除去するために<u>Sal</u> I で消化され、再連結さ れた後、AMA1004宿主細胞に形質転換された。配 列欠失は、マキサムとギルバート[Maxam and Gilbert] の配列決定法により確認され、そして酵素アクセプター は、以下の実施例2、1. において述べるようにして精 製された。得られた株は、図7および8に示される。

【0141】酵素アクセプターは、DNA合成技術を用いて作製された。例えば酵素- アクセプター1 (ED1)は、XhoIリンカーを含む α - 領域が表4に示され 30る合成DNAフラグメント ($5 \rightarrow 3 \rightarrow 3$) と代えられることを除いては、p149から作製された。

[0142]

【表4】

- (1) CAA CAG TTG CGC AGC CTG AA
- (2) AGG CTG CGC AAC TGT TGG GAA GGG CGA TCG
- (3) ACC CAA CTT AAT ACC GAT CGC CCT TCC
- (4). GTA TAA AGT TGG GTA ACG CCA GGG CCT TCC CA
- (5) CAA CGT CGT GAC TGG GAA GGC CCT GGC GTT
- (6) GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CGC CCG GG
- (7) GAT CCC CGG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA

44

【0143】これらのフラグメントは、 1ac Z 遺伝子のアミノ酸 $26\sim4$ 3番の枠内欠失をコード化するものであり、また Bam H I および Bg I の粘着性末端を担うものである。これらのフラグメントはアニーリングされ、ゲル電気泳動により精製され、Bam H I で処理され、そしてB 2 にB 3 を加えたもの(B 2 + B 3)にそして F 2 9ベクター連結された。陽性のコロニーが選択され、そして D N A 配列分析により確認された。

【0144】2.1.相補効率の比較

上記のようにして調製された酵素アクセプターの相補効率を評価するために、代表的酵素アクセプター調製物が H6を酵素-ドナーとして用いて比較された。

【0145】微小力価プレート形態が用いられ、これは2.5×10-8Mの適当な酵素アクセプター調製物および1.25 mg/ml o-ニトロフェノール - β-D- ガラクトピラノシド基質を含む全容量200μlのPM2緩衝液(0.5M Na2HPO4, pH7.0,1 mM Mg SO4,0.18 mM Mn SO4,1 mM ED TA,0.02% NaN3,0.05% トゥイーン20[Tween 20])から構成された。H6の一連の希釈物(1:20,1:40,1:80)が相補を開始するために添加された。光学濃度(414 nm)が、37℃での30分間および40分間インキュベーションで測定された。結果は表5に示される。

[0146]

【表5】

40

A. 37℃での30分間インキュベーション後のOD₄₁₄

H6希釈	EA23	EA14	EA22	EA24	EA20
1/20	0. 118	0. 736	0. 708	0. 273	0. 526
1/40	0. 062	0. 351	0. 361	0. 142	0. 277
1/80	0. 030	. 0. 171	0. 174	0. 071	0. 128

B. 37℃での4.5分間インキュベーション後のOD₄₁₄

H6希釈	<u>EA23</u>	EA14	EA22	EA24	<u>EA20</u>
1/20	0. 299	1. 585	1. 402	0. 579	1. 148
1/40	0. 15 4	0. 766	0. 715	0. 299	0. 610
1/80	0. 068	0. 365	0, 345	0. 147	0. 294

【0147】表5に示されるように、種々の酵素-アク セプターの相補効率は、相当異なるものであった。相対 相補効率は、EA14=EA22>EA20>EA24 >EA23であった。

【0148】実施例2:チロキシンに関する酵素免疫検 定法

この実施例はチロキシンに特異的な抗体を検体結合タン パク質として用いる、チロキシンに関する免疫検定法を 述べるものである。用いられた酵素ドナー -抗原は、E 30 D4であり、また酵素- アクセプターはEA22であ

【0149】<u>1. 酵素アクセプターの調製</u>

β- ガラクトシダーゼの欠失変異体ポリペプチドが、所 望の酵素アクセプター菌株をTYブロス (1リットル当 たりバクトトリプトン[Bacto tryptone] 1 Og、酵母抽 出物5g、NaCl5gおよびグルコース1gを含む、p H7. 5) 中で増殖させることにより調製された。細胞 は42℃で増殖させられた。細胞は遠心分離によって収 獲され、破壊性緩衝液 (BB) (0.2M トリス (登 40 録商標) [Tris (登録商標)] -HCl pH7. 6、 0.2M NaCl、0.01M酢酸マグネシウム、 0.01M 2-メルカプトエタノール 5%グリセロー ル)で洗浄され、次に遠心分離によりペレット化され、 そして凍結された。

【0150】細胞ペレット (15g) は40mlのBB中 に懸濁された。リゾチーム[Lysozyme] (シグマケミカ ル、ミズーリー州セントルイス) が 0.20 mg/mlの最 終濃度へ添加され、懸濁液は、-70℃のアルコール浴 中で凍結され、そして37℃の水浴中で迅速に解凍され 50

た。解凍される懸濁液の温度を4℃以下に保つために注 意がはらわれた。溶解物の粘度は、ビルソニック セル ディスラプター[Virsonic cell disruptor] (モデル1 6-850, ビルティスカンパニー, ニューヨーク州ガ ーディナー[Model 16-850, VirtisCo., Gardiner, NY]) を 用いての音波処理によって低減された。フェニルメチル スルフォニルフルオライド (PMSF, シグマケミカル) が 0. 1 mMの最終濃度へ添加され、そして不溶性物質が 遠心分離 (16,000×g, 30分間) によって除去され た。1/10容量の30%硫酸ストレプトマイシン溶液 がゆっくりと上澄液に添加された。氷上で15分間の 後、沈澱した核酸が16,000×g で20分間遠心分 離することにより除去された。清澄化された溶解物は、 ゆっくりと80%飽和 (NH4)2 SO4 溶液の等容量 を添加することにより、(NH₄)zSO₄で40%飽 和とされた。4℃で2時間の撹拌に続き、沈澱した物質 が、16,000×gで30分間遠心分離することによ り集められた。

【0151】ペレットはBB中に再溶解されそして、水 中に0.1M NaH2PO4、pH7.2、50mM NaCl、1mM Mg SO4、10mM 2-メルカ プトエタノールを含有するものの1000容量に対し て、6時間後に1回交換を行なって、透析された。透析 された酵素- アクセプター抽出物は、同様の緩衝液中の アガロースに共有結合的に付着したp-アミノフェニル-1 ´- チオ -β-D- ガラクトピラノシドの2.5×6cmカラ ムに適用された。カラムは、最初にO. 1M NaPO 4 、 pH7. 2、50 mM NaCl、10 mM 2-メ ルカプトエタノールで、次にO. 1M NaPO₄、 p

れた。

H7. 2、50mM NaCl、10mM2-メルカプト エタノールで、最後に、0.1M NaPO4、pH 7. 2、50mM ホウ酸ナトリウム pH9. 0、10 mM 2-メルカプトエタノール (当容量の2.5M ト pH 7. 0中) を用いて洗浄された。す リス -HCl べてのカラム操作は4℃で行なわれた。

【0152】溶出した酵素アクセプターは直ちに、0. 1M NaH₂ PO₄ pH7. 2, 70 mM NaC l、1mM Mg SO (Mg SO4) および10mM 2-メルカプトエタノールに対して十分に透析された。透 10 析の後、グリセロールが10%まで添加され、そして抽 出物は-20℃で保存された。これらの調製物は、ラエ ムリの不連続ポリアクリルアミドゲル系[Laemmli dis-c ontinuous polyacryl-amide gel system] (ラエムリ, 1980年,ネイチャー 227:690 [Laemmli, 1970, Nature 2 27:690]) においてシングルバンドを生じた。

【0153】2. 酵素ドナーの調製

前記に述べた種々の酵素ドナーポリペプチドは宿主細胞 から直接精製されることが不可能であった。例えば、エ シェリキア・コリ株AMA1004に見出されるこれら のペプチドのレベルはささいなものであった。これに対 して、相補するペプチドに関しコードするプラスミド が、菌株E9001 (Δ<u>lac</u>-pro, <u>thi</u>, <u>sup</u>E, F _proAB, _lac I o , ZM15, また71. 18とも 呼ばれる;メッシングら,1977年,プロ.ナトル.アカ ド. サイ. ユーエスエイ 75:3642~3646[Messing et al., 1977, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3642-3646]) 12 形質転換された場合、活性なβ-ガラクトシダーゼが生 体内相補により形成された。β-ガラクトシダーゼが精 製され、そして該相補するペプチドが、6M尿素を用い 30 ての該酵素複合体の変性により回収された。

【0154】細胞は0.1%グルコース、50μg/ml アンピシリンおよびO.3mM IPTGを追補された ルリア ベルタニ[Luria Bertani] 培地において42℃ で16時間培養された。細胞は遠心分離により収獲され た。以下の段階は、特に記述のない限り4℃にて行なわ れた。

【0155】12リットルの全培養容量からの約40g の細胞が、80mlの緩衝液A (50ml トリス (登録商 標), pH7. 5, 50ml NaCl, 10ml Mg C 40 12,10mM 2-メルカプトエタノール)に再懸濁さ れた。リゾチーム(シグマケミカル、ミズーリー州セン トルイス)がO.20mg/mlの最終濃度へ添加され、そ して該懸濁液は、-70℃のアルコール浴中で凍結され 37℃の水浴中で迅速に解凍された。解凍される懸濁液 の温度を4℃以下に保つように注意がはらわれた。溶解 物の濃度は、ビルソニック セル ディプラスター (M odel 16-850) を用いての音波処理によって低減 された。フェニルメチルスルフォニルフルオライド (P

加され、そして不溶性物質が16,000×gで30分 間遠心分離することにより除去された。 1/10容量の 30%硫酸ストレプトマイシン溶液がゆっくりと上澄液 に添加された。氷上で15分間の後、沈澱した核酸が1 6,000×gで20分間遠心分離することにより除去 された。清澄化された溶解物は、ゆっくりと80%飽和 (NH4) 2 SO4 溶液の等容量を添加することによ り、(NH₄)₂SO₄で40%飽和とされた。4℃で 2時間の撹拌に続き、沈澱した物質が16,000×g で30分間遠心分離することにより集められた。ペレッ トは最小容量の緩衝液B(40mM トリス(登録商 標), pH7. 5, 0. 1M NaCl, 10mM M g С 12, 10 mM 2-メルカプトエタノール) 中に溶 解され、そして同じ緩衝液の200容量に対して透析さ

48

【0156】透析された溶液は、緩衝液Bで平衡化され たDEAE- セルロース (ワットマン DE-52[Wha tman DE-52])の30mlを充填した2.5×20cmカラム にかけられた。カラムは、吸着されていない物質を除去 するために150mlの緩衝液Bで洗浄された。酵素は、 NaClの直線濃度勾配 (40mM トリス (登録商 標), pH7. 5, 10mM Mg Cl2, 10mM 2-メルカプトエタノール中の0.01~0.50M N a C I) で溶出された。それぞれの緩衝液成分の容量は 75mlであり、流速は0.50ml/分であった。分画が 前に述べられたような酵素活性に関して検定された。ピ ーク活性は、約0.3M NaClで表われた。酵素活 性を含む分画はプールされ、そして該プールは (N H4) 2 SO4で40%飽和とされた。2時間の撹拌の 後に、沈澱した物質が12,000×gで30分間遠心 分離することで集められた。ペレットは、最小容量の緩 衝液Bに溶解され、そして次にバイオ- ゲル A-1. 5 m[Bio-Gel A-1.5m]を充填された1. 0×120cmカ ラム (床容量86ml, バイオ- ラッド ラボラトリーズ [Bio-Rad Laboratories], カリフォルニア州リッチモン ド) にかけられた。カラムはO. 10ml/分の速度で緩 衝液Bを用いて展開された。分画は酵素活性に関して検 定され、ピーク活性を含む分画がプールされた。等容量 の100%飽和 (NH4) 2 SO4 溶液がゆっくりと添 加された。氷上で2時間の後、沈澱した物質が、12, 000×gで30分間遠心分離することにより集められ た。

【0157】ペレットは最小容量の50mM KH₂P O₄、 pH7. 3、1 mM EDTA中に溶解された。 溶液1ml当たり0.496gの固相電気泳動純度の尿素 (バイオーラッド[Bio-Rad],カリフォルニア州リッチモ ンド)がゆっくりと添加され、プールの最終尿素濃度が 6. 0 Mにされた。プールは、基質の添加後 5 分間の間 何らの酵素活性も視識されなくなるまで、氷上に保たれ MSF, シグマケミカル)が0.1mMの最終濃度へ添 50 た。変性された酵素プールは次に、セファデックスG-

75 [Sephadex G-75] を充填された1. 0×120cmカラム (床容量84ml, ファラマシア ファイン ケミカルズ[Pharamacia Fine Chemicals], ニュージャージー州ピスカタウェイ)にかけられた。カラムは、6.0M尿素、50mM トリス (登録商標)、 pH7.6、0.15MNaCl、1mM EDTAを用いて0.10ml/分の流速で展開させられた。分画は、M15との相補活性に関して検定された。相補活性を含む分画がプールされた。この分画プールは1mM NH4HCO34リットルに対して3回透析され、そして凍結乾燥さ 10れた。

【0158】<u>3. チロキシン免疫検定法</u>

m-マレイミド- ベンゾイル-L- チロキシン -H6の酵素 - ドナー結合体は以下のようにして調製された。

【0159】L-チロキシン(遊離酸) (680mg)が、 無水メチルアルコール (6.0ml) を用いて転化され、 そして該溶液が乾燥塩化水素の活発な蒸気を用いて飽和 された。冷却の後、飽和手順が繰返され、そして溶媒が 減圧下に除去された。得られた結晶性の沈澱物は濾去さ れ、無水エチルアルコールを用いて洗浄され、次にジエ 20 チルエーテルで洗浄され、そして最後に乾燥された。乾 燥されたチロキシンメチルエステルハイドロクロライド は、50%水性エチルアルコール中に溶解されそして溶 液は2N水酸化ナトリウム(1当量)で処理された。お びただしい量の白色沈澱が直ちに形成されそして付加的 な水が、沈澱を完全にするために添加された。沈澱した L-チロキシン メチルエステル遊離塩基を1時間冷却下 に静置した後、該生成物が遠心分離により回収されそし て真空下に乾燥された。L-チロキシンメチルエステル遊 離塩基 (10mg) とm-マレイミドベンゾイル-N- ヒドロ キシスクシンイミド エステル (MBSE) 5 mg (ピエ ース ケミカル カンパニー[Pierce ChemicalCo.], イ リノイ州ロックフォード)が、無水テトラヒドロフラン 1. Omlに溶解され、続いて粉末無水炭酸ナトリウム1 Omgが添加された。混合物は30分間還流された。螢光 指示薬および溶媒系としての酢酸エチルを含むSi α 250F TLC プレート 50×20cm (ベーカー [Baker], ニュージャージー州フィリップスバーグ)を用 いる、シリカゲルGを利用する薄層クロマトグラフィー (TLC) による反応混合物の調査は、反応が約70% 40 完了したものであることを示した。L-チロキシン メチ ルエステル遊離塩基とMBSFとの生成物である、m-マ レイミド- ベンゾイル-L- チロキシン (MBTM) はク ロロホルム:メタノール混合物を溶離溶剤として用いて シリカゲルカラムにより精製された。単離されたMBT Mの薄黄色の粉末は、TLCにより検定された場合約8 0%純度であり、そして、MBSEあるいはL-チロキシ ンメチルエステルのいずれとも完全に異なるRェを有し ていた。MBTMによって、螢光指示薬を含むシリカゲ ルGにおける短波長紫外線での照射においてチロキシン 50

に関する特有の燈色を呈し、またニンヒドリン陰性およびマレイミド基の存在は、5,5'- ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) を用いてシステインと反応するそれの能力によって確認された。

50

【0161】本実施例は、酵素ドナーとしてのH6-チロキシン結合体、酵素アクセプターとしてのEA23、抗チロキシン抗体、および一連の濃度のチロキシンを用いる、検体としてのチロキシンに対する免疫検定を例示するものである。

【0162】該検定のための試薬は、以下のように調製された。

L-チロキシン標準: 2.6 mg L-チロキシン (シグマケミカル、ミズーリー州セントルイス) が無水エタノール 200μ l に溶解された。次に0.15M NaHCO 3800μ l が添加されそして混合物は 25° で保存された。チロキシンの2倍希釈が、エタノール: 0.15 M NaHCO 3(1:4) で調製された。

【0163】L-チロキシン抗体:チロキシン (T4) に対する抗血清がウェスタン ケミカル リサーチ コーポレーション[Western Chemical Research Corp.]、コロラド州デンバーから購入された。いくつかのロットが力価に関して試験され、そして平衡定数が Ig M Sorb (エンザイムセンター[Enzyme Center]、マサチューセッツ州マルデン)を用いてのラジオイムノアッセイにおいて決定された。ロット群は、1:100から1:800の力価で変化した。平衡定数は 4.5×10^8 L/Mから 1×10^{10} L/Mで変化した。力価1:8000(ゼロ結合=67%)で、 $Keq=2\times10^{10}$ L/MであるロットナンバーA420が用いられた。

【0164】EA23アクセプター酵素:保存緩衝液中 の6.3×10⁻⁷M。

【0165】基質:0-ニトロフェニル $-\beta$ -D- ガラクトピラノシド(ONPG)は2. $5 \times Z$ 緩衝液に溶解され最終濃度10 mg/ml溶液とされた。

【0166】検定は、微小力価プレート(ダイナテック

カタログナンバー001-012-9200 アメリカン サイエンティフィック プロダクツ、カリフォルニア州サニーヴェール[Dynatech Cat# 001-012-9200 Am erican Scientific Products, Sunnyvale CA) 中で行なわれ、そして414nmフィルターを備えたティタータックマルチスキャン微小力価プレート リーダー[Titerta k Multiscan microtiterplate reader] (フロウ ラボラトリーズ、メリーランド州ロックビル[Flow Laboratori es, Rockvill, MD])において読み取られた。それぞれのウェル (窪み[well]) に対し0.05%トゥイーン 20*10

*[Tween 20](ポリオキシエチレン ソルビタン モノラウレート)(シグマケミカルカンパニー、ミズーリー州リセントルイス)を含む PM 2 緩衝液が添加された。それぞれのウェルに対して、連続的に、H6- チロキシン結合体 2. 5μ 1、抗チロキシン抗体 2. 5μ 1、チロキシン標準物質 2. 5μ 1 および EA 2 3 4 0 μ 1 が添加された。結果は表 6 に示される。

52

[0167]

【表 6 】

チロキシンに対する酵素免疫検定

ウェル			チロキシン (μg/μ1)		
1	-	-	_	40	0. 002
2	2. 5	-	_	_	0.001
. 3	2, 5	_	_	40	0. 595
4	2. 5	2. 5	-	40	0. 300
5	2. 5	2. 5	6. 25	40	0. 312
6	2. 5	2. 5	12. 5	40	0. 320
7	2, 5	2. 5	25	40	0.364

- (a) H6-T4はm-マレイミド- ベンソイル-L- チロキシン -H6結合体 をさす。
- (b) EA23は酵素- アクセプターポリペプチドをさす (図7参照)。

【0168】<u>実施例3:B型肝炎ウィルス表面抗原検定</u>この実施例は、酵素ドナーとしてN-末端あるいはC-末端 40融合タンパク質を用いての、B型肝炎ウィルス表面抗原(HBV-SAg)を測定するための免疫検定法を例示するものである。

【0169】1. N- 末端融合体

子のほとんどを含むBamHI-AhaIIIフラグメントが、BamHIおよびSmaIで消化された pUC13中に挿入された。この組換えDNAプラスミド p122がエシェリキア・コリのJM83株中へ形質転換され、そしてHBV-SAg 酵素-ドナーによる生体内相補を示す、Xgal プレート上のライトブルーのコロニーが選択された。このクローンMG122は、アボット アウスザイム II(1)試験[Abbott Auszyme II(1) test](アボット ラボラトリーズ, [Abbott Laboratories],イリノイ州シカゴ)における交差反応によってHBV-SAg を含むことが明らかにされた。このHBV-SAg を含むことが明らかにされた。このHBV-SAg の-ドナー融合体は、大量の融合体を生成するために

他の発現ベクター中へ移入されることができる。

【0170】<u>2.C-末端融合体</u>

例えば、B型肝炎表面抗原 (HBV-SAg)は、酵素ド ナーポリペプチドのカルボキシ末端でクローニングされ 得る。用いられ得る一つの処方は、例示的実施例として 以下に簡単に概要される。

【0171】1. 2kb FnuDIIフラグメントが、完 全HBVゲノムのクローンから単離されそして pBR3 22中に挿入された。S1ヌクレアーゼおよび子ウシ腸 化物が次に、完全な長さの線状分子を得るためにアガロ ースゲル精製された。 p125の線状DNAへのFnuD IIフラグメントの連結に続き、このDNAはエシェリ キア・コリ (例えば J M 8 3) 中へ形質転換される。 X gal プレートにおいて30℃で白色でかつ42℃で青色 のアンピリシン耐性のコロニーが次に選択され、HBV -SAg における産生に関してスクリーニングされた (例えば、アボット アウスザイム II試験)。融合 タンパク質は、次に相補性に関し検定する標準的イオン 交換およびアフィニティカラム技術によって精製され

【0172】3. HBV-SAg に関する酵素免疫検定 試料中のHBV-SAg の存在あるいは量を測定するた めの免疫検定法が、関心の試料中の未知のHBV-SA g をα- HBV-SAg 融合タンパク質と、相同性を有 する抗原に関して競合させることにより作製された。活 性なβ- ガラクトシダーゼを生成するようにEA23を 相補するのに有効な遊離α-HBV-SAg タンパク質 の量は、計測される未知の遊離HBV-SAg の量に逆 比例するであろう。

【0173】実施例4:肝炎B型ウィルス コア抗原検 <u>定法(アッセイ)</u>

肝炎B型ウィルス (HBV) ゲノムDNAを制限酵素B amH I および Eco R I で切断して 2 個の大きな DNAフ ラグメントを産生した。これらの大きなフラグメントの 1つは、コア抗原をコード化するコア遺伝子を有する (HBV-CAg)。このフラグメントをM13 mp10RF DNAの多クローニング部位に挿入した。このH BV挿入物を有するM13ファージの選択およびスクリ ーニング後、小量のファージを精製した。コア遺伝子の 40 (-) 極性鎖 (メッセンジャーRNAの反対極性) を有 する一重鎖DNAをファージから単離した。

【0174】大部分の遺伝子のように、コア遺伝子はA TGコドン (遺伝暗号) から始まる。コア遺伝子がクロ ーニングされた発現ベクターは、すでにATGコドンを 与えられているので第2コアコドンから始まるDNAフ ラグメントを得ることが必要であった。このことは、コ ア遺伝子のコドン2-5の (+) 鎖 (メッセンジャーR NAと同一極性)を示す12塩基対の一本鎖オリゴマー を合成することにより達成された (GAGATTGAC 50

CCT)。このオリゴマーは一本鎖M13ファージDN Aに対してハイブリッド形成され、エシェリキア・コリ (E. Coli) DNAポリメラーゼ I (クレノウ フラグメン ト) により試験管内で [<u>in</u> <u>vitro</u>] 伸長された。この 調製物を、コア遺伝子の外部のHBV DNAを翻訳終 結コドンの3´側で切断するHinc IIで消化した。そ の後に、ヌクレアーゼS1は、一本鎖DNAをコア遺伝 子の第2コドンの5´側を消化するために使用された。 これは、686塩基対フラグメントおよび多数の小さな ホスファターゼで処理された、 p125の Pvu I 部分消 10 種々の長さの二重鎖フラグメントを残す。686の塩基 対フラグメントをアガロースゲル電気泳動法により精製 した。使用されたプラスミド発現ベクターは、Pr プロ モーターおよび制限酵素BamHIの次にATG出発コド ンを有した。ベクターを<u>Bam</u>HIで消化し、ヌクレアー ゼS1で処理し、平滑端末を有する(ブラント エンド 化)ベクターとした。

> 【0175】ブラント エンド化発現ベクターおよびコ ア遺伝子フラグメントをT4 DNAリガーゼを使用し て連結し、そして受容能力のあるバクテリアに形質転換 20 した。得られたコロニーをスクリーニングし、プラスミ ドを同定し、通常の配向性でコア遺伝子を挿入した。ザ アボット コア アンチゲン イーエルアエスエイテ スト(the Abbot Core Antigen ELISA test)(アボット ラボラトリーズ) により、コロニーは細胞溶解産物中の 抗原タンパク質の存在に関し試験された。プラスミド p 152を含有するMG152として呼称される強力な免 疫反応陽性クローンが選択され、DNA配列はマキサム ーギルバート (Maxam-Gilbert) DNA配列法により確 認された。コア抗原は精製され、抗体を再産生するため に使用された。

【0176】pF29のα領域のアミノ末端における制 限部位のいずれもがα領域とコア遺伝子との融合に適さ ないために、α遺伝子のアミノ末端において多クローニ ング領域中の異なる制限部位を有する第2プラスミドを 構築することが必要であった。 pUC13をEcoRIで 消化し、粘着性末端をDNAポリメラーゼ ラージフラ グメント (クレノウフラグメント) に全ての4つの dN TPs を加えたもので満たした。Pvu I I 8 bp (GCA GCTGC) リンカーDNAはこの部位に結合した。こ の修飾プラスミドを、BamHIとPvuIIで消化し、多 クローニング部位にPvuIIリンカーを加えたα- 断片 のN-末端を単離した。 pF29プラスミドDNAを同様 にBamHIとPvuIで消化し、pF29α-領域を除去 し、α領域のN-末端の多クローニング領域中に新規配列 を含むα-領域と置換した。この新しいプラスミドは、 p154と呼称された。

【0177】コア -α融合タンパク質を構築するため に、Pr 制御下の p152からのコア遺伝子を p154 のα- 遺伝子の多クローニング部位に挿入した。 p15 4 DNAを制限酵素 Bcl I と Ava I で消化した。この切

断により生じた介在DNAフラグメントは、大部分のC I遺伝子およびPr プロモーターにコア遺伝子を加えた ものを有するがコア遺伝子の4つの3´- 末端コドンを 有しない。このDNAフラグメントをアガロースゲル電 気泳動法により精製した。プラスミド p154を制限酵 素Bcl I およびXma I で消化し、介在片を除去し、 p1 52からのBcl I-Ava I DNAフラグメントと置換 した。これゆえ、4つの末端3'コドンのないPr 制御下 のコア遺伝子は、ΗΒ Vコア抗原 - α 融合ペプチドを発 多クローニング部位に挿入された。この新しいコア -α を発現するプラスミドをプラスミド p157と称する。 融合ペプチドを精製し、実施例3の方法に類似する方法 で肝炎コア抗原用イムノアッセイ (immunoassay)を構 築するために抗体とともに使用可能である。

【0178】 実施例5:ヒト絨毛性ゴナドトロピンのた めの免疫検定

1. 製剤 組換法によるヒト絨毛性ゴナドトロピン酵素 ドナー融合ペプチド

この実施例は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン $(\beta-hCG)*20$

*のための免疫検定に使用するβ-hCG融合ペプチドの構 築を示す。

56

【0179】hCGは、α (16, 000ダルトンM W) およびβ (22, 000ダルトンMW) と呼称され る2つの非共有結合性結合サブユニットから成る糖タン パク質である。 αサブユニットは hCGおよび関連する 糖タンパク質、ロイトロピン (LH)、チロトロピン (TSH) およびフォリトロピン (FSH) に共通であ る。これらホルモンのβサブユニットは、別個のもので 現する枠内遺伝子融合を生成する p154のα- 領域の 10 あるけれども、高度のアミノ酸相同性を有する。しかし ながら、 $hCGO\beta$ サブユニットは、カルボキシ末端に 非反復の30のアミノ延長を含んでいる。

> 【0180】この非反復配列は、組換えDNA技術によ り構成された。4つのDNAフラグメントは、アプライ ド バイオシステムズ インコーポレーテッド(Applied Biosystems, Inc)社のモデル380A DNAシンセサ イザー (実施例1、1.4で説明した) で合成され、次 の配列を有する:

[0181]

【化12】

CAAGCCCATCCCGACTC3'

(b) bCGS2 (37 mer)

(a) hCGS1 (62 mer)

- 5' CCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAATAAG3'
- (c) hCGN1 (62 mer)

5' CCCGGAGTCGGGATGGGCTTGGAAGGCTGGGGGGGAGGGGCCTTTGA GGAAGAGGAGTCCTGG3'

(d) hCGN2 (37 mer)

5' TCGACTTATTGTGGGAGGATCGGGGTGTCCGAGGGCC3'

【0182】DNAフラグメント(a) と(b) を連結し、 フラグメント(c) と(d) を連結した。これら2つの相補 的DNA鎖は、アニーリングされて以下に示された β -h GGサブユニットの30アミノ酸カルボキシ末端延長を※ ※コードするDNAフラグメントを形成した:

[0183] 【化13】

Eco RI

AATTCCAGGACTCCTCTTCCTCAAAGGCCCCTCCCCCAGCCTTCCAAGCCCATCCCGACT GGTCCTGAGGAGAAGGAGTTTCCGGGGAGGGGGGGTCGGAAGGTTCGGGTAGGGCTGA

CCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAATAAG GGGCCCCGGGAGCCTGTGGGGCTAGGAGGGTGTTATTCAGCT

【0184】DNAフラグメントは、次の翻訳終止コド ンTAAの3'端に5'EcoRI制限酵素部位およびSalI 制限酵素部位を含む。

【0185】このDNAフラグメントを実施例4で製作 したプラスミド p154に挿入した。プラスミド p15 50 4をEcoRIおよびSalIで切断し、酵素ドナー(E

20

D) 遺伝子から ω - 領域を除去し、アガロースゲル精製した。EcoRI-SalI β -hCG DNAフラグメントをゲル精製した p154ベクターと連結した。得られたプラスミド、 p166と称するは、 $ED-\beta$ h CGカルボキシ末端融合ペプチド(図28参照)をコードする遺伝子を含む。酵素ドナーペプチドED166は93のアミノ酸を含む;下記のようにアミノ酸の1 \sim 63番目は α -ドナードメインをコード化し、アミノ酸の64(*) \sim 93番目は β -hCGカルボキシ末端をコード化する:

【0186】 【化14】

> 5 10 Met Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Cys Ser Cys Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gin Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu 35 Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe 45 Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg 55 The Asp Arg Pro See Gln Gln Leu Arg Ser *64 65 Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys 75 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser 85 90 Arg Len Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro 11e Leu Pro Gln

【0187】第 2β -hCG融合ペプチドを第1に次の配列のDNAフラグメントを合成することにより構築した:

【0188】 【化15】

CGCGAATTCTAGATAAATGAG (21 mer)

TAGCGCTTAAGATCTATTTACTCAGCT (27 mer)

Pvu I Eco RI Sal I

【0189】プラスミド p154をBamH IとPvuI と で切断し、小さな α - ドナー領域をゲル精製した。Bam H I - PvuI フラグメントをDNA合成フラグメントと 連結した。このフラグメントをBamH I - EcoR I で切断し、より小さな α - 領域ドメインを p1660BamH I - EcoR I α - ドメインで置換した。得られたプラス 50

ミド、 p1 7 5 と称するは、8 5 アミノ酸の酵素ドナー (ED1 7 5) をコード化する。下に示すように、アミノ酸の1~5 5番目は α - ドナードメインをコード化し、アミノ酸の5 6 (*) ~8 5番目は β -hCGペプチドのタンパク質をコード化する:

58

【0190】 【化16】

5 10 Met Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Cys Ser 15 Cys Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg 25 Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu 35 Leu Asn Arg Leu Ala Ala Bis Pro Pro Phe 45 Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg 55 *56 Thr Asp Arg Glu Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr 85 Pro Ile Leu Pro Glu

30 【0191】 β -hCGカルボキシ末端配列に融合した他の α -ドナードメインは、実施例1、1. 4および図15に記載したH6 α -ドナードメインと同じアミノ末端を共有する。ED H6を含むプラスミド p169をBamHIとEcoRIで切断し、直線状ベクターをゲル精製した。合成DNAフラグメント、H6PM、は次の配列であり、プラスミド p169に挿入された。

【0192】 【化17】

40

Sma [Sac]
GATCCCCGGGCGGGGTTAA
Ban HI 塩基↑変更

【0193】この合成DNAフラグメントの挿入はEcoRI部位を破壊したがアミノ酸配列を変化させなかった。それゆえ、得られたプラスミドはEcoRI部位を有しない。 α -ドメインをBamHIおよびPvuIでの消化によりこのプラスミドから除き、p154のBamHIおよびPvuIでの消化(p175の構成で上記に記述)の

後、 p154中へ置換して p174を形成した。

【0194】プラスミド p174は、51 アミノ酸の α - ドナードメインをコード化し、酵素ドナーの α と ω 領域の間に EcoR I 部位を有する。 α - ドナードメインを BamH I と EcoR I での消化により p174 から除き、ゲル精製した。プラスミド p166を BamH I と EcoR I で消化し、p174 からの α - ドナードメインを p166 に挿入した。得られたプラスミド p177 は、カルボキシ末端 β - h C G D N A フラグメントに融合した α - ドナードメインを含む。この酵素ドナーペプチドED 10 177 は 81 の アミノ酸を含む。このように、ED 177は ED 175 より 4 つの アミノ酸だけ短いものである。

【0195】2. ヒト絨毛性ゴナドトロピン検定 この実施例は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のための高感度な均質系のクローン化酵素ドナー免疫検定を示す。さらに、この実施例において第2抗体(ウサギ抗-hCG)の付着はEA22との相補の抑制効果を高める(以下の実施例9を参照)。

【0196】 β -hCG酵素ドナーを実施例5、1. に記 20載したようにして構築した。この実施例において、ED175を酵素ドナーとして使用した。

【0197】免疫検定は微小力価形態を使用して行なっ た。 50 μ l の適切な濃度の hCG (1×10³、3× 10³ および5×10³ mIU) ; 50 μ 1の1:10 O希釈ポリクローナルウサギ 抗-hCG抗体 (ロットナ ンバー 01-302-57, イムノサーチ ニュージャージ州ト ムスリサーチ(Immunosearch, Toms River, NJ)) および5 0 μ l の E D 1 7 5 (1 × 1 0 - 8 M) を 加えて 免疫検定 を行なった。全ての希釈度はPM2緩衝液におけるもの 30 であった。反応混合物を37℃で30分間インキュベー トした。50μ1の1:10希釈液のヤギ抗ウサギ抗体 を加え (アンチボディーズ インコーポレーテッド, カ リフォルニア州ディビス (Antibodies, Inc., Davis, C A))、そして反応混合物を37℃で30分間インキュベ ートした。そしてその混合物を50μ1の酵素アクセプ ターEA22 (1×10⁻⁷M) およびONPG基質 (5 mg/ml) と反応させた。微小力価プレートを37℃でイ ′ンキュベートしそしてOD414 を測定した。

【0198】結果を図29に図面で示した。この実施例 40 は、均質系の免疫検定の使用に適する服用量-応答曲線 を示す。この検定は腫瘍マーカーとしてまたは妊娠の指示薬のいずれかとして h C G 用テストとして使用し得る。

60

【0199】<u>実施例6:ビオチンに対する検定</u> この実施例は、検体結合タンパク質として糖タンパク質 アビジンを使用するビオチンに関する競合的結合検定を 示す

【0200】アビジン(MW=67, 000ダルトン)は、会合定数 10^{16} L/Mで、ビオチン(MW=244ダルトン)と結合する。ビオチンをH6065番目のリシンおよびN-末端 α - アミノ基と結合させた。酵素ドナーにカップリングしたアビジンがEA23との相補を阻害したかどうかを決定するために、検体結合タンパク質として溶液中のアビジンを使用した。

【0201】ビオチンと酵素ドナーH6とのカップリン グを次のように行なった。実施例1に記載したようにし て調製した凍結乾燥化H6を0.15mlの0.1Mリン 酸ナトリウム、 pH 7. 5で溶解し、室温で撹拌した。 N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中で10mg/mlの N-ヒドロキシヌクシニミドビオチン (シグマ ケミカ ル, セントルイス, ミズーリー州(Sigma Chemical, St. L ouis, MO)) の 5μ 1アルコート2つを加えた。室温で1 時間放置後、その溶液を遠心分離処理し、上澄液を pH 9. 0の0. 1Mホウ酸ナトリウムで平衡にしたバイオ ゲルP-2 (Bio-Gel P-2)(0.6×16cm) サイジング (バイオラッド ラブス, リッチモンド, カルフォルニ ア(Bio-Rad Labs, Richmond, CA)) に加え、同じ緩衝液で 溶出させた。10滴の分画を集め、ビオチニル -H6結 合体を含む分画(すなわち、相補活性)をプールした。 【0202】予備実験において、相補性の阻害に必要な アビジン濃度を決定するために滴定が行なわれた。PM 2緩衝液、ビオチン化H6、アビジン、EA23および 基質o-ニトロフェニル -β-D- ガラクトピラノシドを微 小力価プレートに加えた。37℃で15分間後、414 nm (OD414) における光学密度を測定した。表7は、 それらの結果を示す。このデータは、0.5 μgのアビ ジン (7. 5×10⁻¹²モル) が相補反応を75%阻害 することを示す。

[0203]

【表7】

アビジン^a への結合による相補性の抑制

アビジン				
ウェル 	(µg)	OD ₄₁₄		
. 1	0	0. 545		
2	0. 1	0, 499		
3	0. 2	0.438		
4	0. 3	0.370		
5	0. 5	0.133		
6	1. 0	0.123		

(a) 記載のごとく調製された 2. 5μ 1のピオチン化 H 6; 20μ 1のEA 23 (3. 6×10^7 M);および 100μ 1の基質 0-ニトロフェニル $-\beta$ -D- ガラクトピラノサイド (ONPG) (10mg/ml)を使用した (ウェル 当り)。十分なPM 2級衝液を最終容積 200μ 1になるように各ウェルに加えた。

【0204】遊離D-ビオチン(シグマ ケミカル,セン トルイス, ミズーリー州(Sigma Chemical, St. Louis, M 0)) 濃度を変化させて加えて競合的結合曲線を描いた以 外は、ビオチン用競合的結合検定を予備実験用に記載し た方法で行なった。これゆえ、各ウェルは5μ1のビオ チン -H6:0. $5 \mu g$ のアビジン; $20 \mu 1$ のEA2 3 (3. 6×10^{-7} M); $100 \mu 100$ NPG (10 mg/ml) 基質、および1~8 μ l D-ビオチン (1 μ g/m 30 1) と十分なPM2緩衝液を加えて全容積約200 μ 1 としたものを含む。15分間後、光学密度 (414nm) を測定した。データを図9の図面で示す。以上のように この検定系は、1~8 mgまたは4~32×10⁻¹² Mの ビオチン用の良好な検定を提供する。アビジンービオチ ン系 (Ka=2×10¹⁵L/M) は、15分間検定以内 で相補性 (Ka = 1 ~ 2 × 1 0 ⁵ L/M) を制御するの に十分な親和性を有する。

【0205】<u>実施例7:ビオチンのための不均質系の相</u> 補性検定

この実施例は、特異検体結合タンパク質としてアビジンを使用するビオチンのための不均質系の検定系を示す。 酵素アクセプターはEA23であり、酵素ドナーはビオチンにカップリングしたCNBr2である(以後、CNBr2-ビオチン結合体と称する)。

【0206】CNBr 2- ビオチン結合体を次のように合成した: 900μ gの親水化CNBr 2ポリペプチドを pH7. 50300μ lの0. 1 Mリン酸ナトリウム 緩衝液に溶解させた。2. 1 mgの[N- ヒドロキシ-(d-ビオチン スクシミド エステル、またはN-ヒドロキシス 50

クシミドビオチン)スクシミド活性化ビオチン(シグマケミカル コーポレーション、セント ルイス,ミズーリー州[Sigma Chemical Co., St. Louis, MO])]を含む 2 $00\mu1$ アリコートのN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)を室温で撹拌しながら $200\mu1$ アリコートづつ加えた。 2 時間後、反応混合物を pH9. 000.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液を使用するバイオゲル P-2 (Biogel P-2)カラム(1. 5×48 cm)のグラマトグラフィーにかけた。 CNBr2-ビオチン結合体を含む分画をEA23との相補反応により同定した。

【0207】アビジン固定化アガロース(アビジン- アガロース,シグマ ケミカル コーポレーション,セントルイス,ミズーリー州[Sigma Chemical Co.,St. Louis,MO]を 1μ 1懸濁液当り17.5ユニット(1ユニットは 1μ gのビオチンを結合する。))仕入品を、低ゲル化温度アガロース懸濁液(6 mg/ml)で希釈して所定レベルのアビジン- アガロースを得た。

0 【0208】<u>1. アビジン- アガロースによるCNBr</u> <u>2- ビオチン相補活性阻害</u>

 20μ 1のCNBr2-ビオチン結合体貯蔵品(5×1 0⁻⁷M)、 90μ 1のPM2バッファーおよび 20μ 1 の各種希釈度のアビジン-アガロースをエッペルドルフ (eppendorf) バイアル (小びん) 中で充分に混合し、室温で10分間インキュベートした。その後、バイアルを5分間遠心分離機にかけて 100μ 1の上澄液を各バイアルから除いて各 ϕ 10 μ 1EA23貯蔵品(1.5×10^{-6} M)を含む微小力価ウェルに入れ、37Cで15分間インキュベートした。その後、基質ONPG(10

mg/mlのものを $100\mu l$)を加え、414mmにおいて各ウェルの吸光度を37℃で30分後測定した。それらの結果を図10の図面で示す。

【0209】2. 固定化アビジンに対するCNBr2-ビオチン結合体とのビオチンの競合

上記のごとく決定した力価を使用して、ビオチン投与量応答曲線は、下記のように得られる。 $20\mu1$ のアビジン-アガロース懸濁液(全量0.35ユニット)および $90\mu1$ の各種レベルのビオチンを含有するPM2緩衝液をエッペンドルフバイアル中で充分に混合し、室温で 10分間インキュベートした。その後 $20\mu1$ のCNBr2-ビオチン結合体貯蔵品(5×10^{-7} M)を加え、充分に混合し、室温で10分間インキュベートした。バイアルを5分間遠心分離機にかけ、 $100\mu1$ の上澄液を各バイアルから除いて各 $\phi10\mu1$ EA23貯蔵品(1.5×10^{-6} M)を含有する微小力価ウェルに入れ、37℃で15分間インキュベートした。基質 ONPG(10mg/m1のものを $100\mu1$)を加え、各ウェルの吸光度を414mで、37℃で30分間インキュベートした後に測定した。投与量応答曲線を図110回面*20

*で示す。そのような曲線は、未知サンプル中のビオチン 量を定量するために使用し得る。

【0210】<u>実施例8:ジゴキシンのための酵素免疫検</u> 定

この実施例は、検体が強心性ジギタリス グリコシドジゴキシンであるエンザイム イムノアッセイ (酵素免疫検定法) について示す。検体結合タンパク質は、ジゴキシンに特異な抗体である。さらにこの実施例は、検定の作用機構がカストロおよびモンジ(Cartro and Monji)により記載された β - ガラクトシダーゼを使用する立体障害エンザイムイムノアッセイとは類似していないことを示す (1981, メソッドス イン エンザイモロジー73:523 -42 (Methods in Enzymology73:523-42))。

【0211】1. ジゴキシン -H6結合体の調製

下式で表わされるジゴキシゲニン、特に3-o[m-マレイミドフェニルカルバミル] ジゴキシゲニンのウレタン誘導体 [以後、「ジゴキシン-マレイミド付加物」と称する] を次のように調製した。

[0212]

【化18】

【0213】マグネット撹拌装置、アルゴン入口および 還流冷却器を備えた、乾燥10回1丸底フラスコへ、3-カ ルボキシフェニルマレイミド (67mgまたは0.307 ミリモル)、乾燥ベンゼン (3 ml) および乾燥トリエチ ルアミン (0.043mlまたは0.307ミリモル)を 加えた。混合物を30分間還流した。アリコートの赤外 線スペクトル分析 (IR) はカルボニルアジド (215 O cm⁻¹) への転化を示した。ジゴキシゲニン (8 O mg ま たは0.205ミリモル) および乾燥テトラヒドラフラ 40 ン (2 ml) をその後反応混合物に加えた。3.5時間の 還流後、反応混合物を酢酸エチル (100ml) で希釈 し、50mlの冷却1%NaOH水溶液で一度洗浄し、5 Oml飽和Na HCOs 水溶液で一度洗浄した。その後、 有機相を無水Mg SO4 で乾燥し濾過し、溶媒をロータ リーエバポレータを使用して除いた。残留物を約1~2 mlのアセトンに溶解し、2つの調製用薄層クロマトグラ フィー (TLC) プレート (1500 ミクロン シリ カゲル アナルテック ユニプレート, アナルテック, ネワーク, デラアェアー(1500 micron silica gel Anal 50

techuniplate, Analtech, Newark, DE))にかけた。アセトンの蒸発後、プレートを80/20=酢酸エチル/ベンゼンで溶出した。未反応ジゴキシゲニンをプレートから、プレートからの補正UV活性帯をこすり取ることにより除き、30mlの酢酸エチルで3回洗浄した。この方法を上記ジゴキシゲニンの次の二つのスポットに繰り返した。この精製は、ジゴキシゲニン(26mg)、好適な産品ジゴキシン-マレイミド付加物(31mgまたは未反応出発物質に対して37%の収率)および12-o-(m-マレイミドフェニルカルバミル)-ジゴキシゲニン(28mgまたは未反応出発物質に対して33%の収率)を与えた

【0214】薄層クロマトグラフィーは、2.5%Me OH- CH $_2$ C I $_2$ 中でジゴキシン- マレイミド付加物 純度を確かめるために実施された。もしさらに精製が必要であれば、3%Me OH/CH $_2$ C I $_2$ (2 溶離)による調製用TLCによって最高に達成される。ジゴキシンーマレイミド付加物は、次のスペクトル特性を示し

[0215]

* *【化19】

IR(nujol mull):3490,3350,1805,1760,1725,1700,1615,1550,1460,1305,1240,1160,960,935,905,880,840,810,790,710 $_{\text{CM}}^{-1}$. (NMR,核磁気共鳴 アセトン d $_{6}$):0.8(3H,s),0.93(3H,S),3.38(1H,brs),3.40(1H,q,J=4.78Hz(,4.84(2H,t,j=1.5Hz),5.00(1H,m),5.78(1H,t,j=1.5Hz),6.98(s,2H0),6.8-7.7(4H,m),8.75(1H,brs),マススペクトル(CDI-NH $_{3}$):622(H+NH $_{4}$ $_{1}$),605(H+H $_{1}$),587(H+H $_{2}$ -H $_{2}$ 0),391,373,355,337,214,191,189.

【0216】ジゴキシン- マレイミド付加物をベックマン モデル332高性能液体クロマトグラフィーシステム (ベックマン インストルメンツ, インコーポレーテッド, パロ アルト, カルフォルニア(Beckman Instrument, Inc., Polo Alto, CA))を使用する RP-8シンクロパック $250\times10\,\mathrm{mm}\,\mathrm{I}$. D. (シンクロム, インコーポレーテッド, リンデン, インジアナ(SynChrom, Inc., Linden, ID))でさらに精製した。勾配溶離を $1.5\,\mathrm{ml}$ 20 /分の流速で60分かけて H_2 O中000~80%アセトニトリルで実施した。ジゴキシン- マレイミド付加物をプールし、凍結乾燥した。

【0217】その後、精製ジゴキシン- マレイミド付加物を上記のごとく調製した酵素ドナーH6とカップリングさせ、酵素ドナー検体結合体であるジゴキシン - H6を形成した。H6 (1.5 mg)を pH6.0で240 μ 1のアセトニトニル-50 mMリン酸ナトリウム (3:2)に溶解した。ジゴキシン-マレイミド付加物 (1.0 mg)を37℃で2時間保持した反応混合物に直接加え30た。カップリング反応が完了後、60 μ 1アリコート混合物をボンダパック(登録商標)フェニルカラム(Bondapak (登録商標) Phenyl column) 10×30 cm (ウォーターズアソシエーツ、ミルフォード、エムエイ(Waters Associates, Milford, MA))に注入した。カラムを60分間H2O中の勾配の~80%のアセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸で展開した。酵素ドナー活性を含有するサンプルをプールした。

【0218】2.ジゴキシンのための免疫検定法本発明の方法により調製された酵素免疫検定系において、酵素アクセプターおよび酵素ドナー結合体(すなわち、検体にカップリングした酵素ドナー)濃度の異なる組合せは、相補プロセスにより与えられたβ-ガラクトシダーゼ濃度を生じるために使用し得る。質量作用の法則は、酵素アクセプターの比較的高濃度状態で、相補プロセスにおける抗体の阻害効果が緩和されることを必要とする。このことは、検体、例えばジゴキシンの変化する濃度に対し投用量応答特性が平坦またはないということにより明らかである。反対に、酵素ドナー結合体の比較的高濃度状態(抗体に対して)で、相補プロセスにお50

ける抗体の阻害効果も失なわれる。後者の状況は、投用 量応答特性が平坦またはないということにより、そして 高められたバックグラウンドによっても明らかである。 【0219】この実施例は、従来のエンザイムイムノア ッセイの如く酵素アクセプター、酵素ドナー、および特 異抗体の相対濃度が検体に関する診断学的検定の使用に 好適な精度(傾き)および感度を有する服用量応答特性 を示す検定をつくり出すために規定されなければならな いことを示す。

66

【0220】微小力価形態を使用する一連の実験において、システム感度をジゴキシン-H6酵素ドナーとEA23酵素アクセプター濃度の異なる組合せを使用して決定した。

【0221】各々50µ1のジゴキシン(検体)、酵素 ドナーH6ジゴキシン結合体、ジゴキシンに特異な抗体 (抗ジゴキシン) および酵素、酵素アクセプター (EA 23) および基質としてのo-ニトロフェニル - β-D- ガ ラクトピラノシド (ONPG) 5 mg/リットルを含む溶 液の4つを順次加えて検定を行なった。全ての希釈はP M2緩衝液 [0.5M Na2HP4、1mM Mg S O₄, 0. 18 mMM n SO₄, 1 mM EDTA, 0.02% NaNaおよび0.05%のトウーン20 (Tween 20) (ポリオキシエチレン ソルビタン モノラ ウレート,シグマ ケミカル コーポレーション、ミズ ーリー州セントルイス(polyoxyethylenesorbitan monol aurate, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)]において行 なった。ジゴキシン検体濃度は、0,1,10,10 0, 200, 500および1000ng/mlであった。ジ ゴキシンに特異な抗体は、ジゴキシン結合体を次のよう にウサギ中に注入することにより得られた:2. Omlの 完全フロイント(Freund)アジュバント(補助薬)の全容 積中の50μgの結合体を使用して初回の筋内注入を行 なった。ブースター (筋内) を1.0mlの完全フロイン トアジュバンドの全容積中の25 μgの結合体でもって 4週間間隔で投薬した。50mlの血を初回の注入から9 0日間、2週間ごとに集めた。内側動脈の切開または耳 周縁静脈の切開により集めた。血液を凝結させ、30分 間1000×gで遠心分離機にかけたのち上澄液として

25ml血清/50ml血液を回収した。

【0222】結果を図12および図13に図面で示す。 図12および図13の投与量応答曲線を比較すると酵素 アクセプターまたは酵素ドナー結合体のいずれかの濃度 を選択的に減少すると急勾配となり、それゆえにさらに 感度の高い投与量応答曲線となることが判る。

【0223】3. ジゴキシン免疫検定の機構

抗ジゴキシン抗体と酵素ドナージゴキシン結合体との反応が、重合したβ-ガラクトシダーゼ酵素による基質転化よりも相補プロセスを阻害するかどうか決定するため 10 に、相補プロセスは一連の実験において抗体の添加前にプロセスを完了させられた。

【0224】実験処方は次のようであった:300μl のPM2緩衝液とジゴキシン -H6結合体を60分間1 50μlの酵素アクセプターEA23(4.1×10⁻⁶* *M) と反応させた。このことは相補性が完了することが 認められた。上記反応混合物のアリコート(125μ 1)を除き、ウサギ抗ジゴキシン抗体(PM2緩衝液で 1:100に希釈した)のアリコート(50μ1)に加 えた。反応混合物をその後30分間インキュベートし た。この期間の終了時にONPG基質(最終濃度1mg/ ml)を加え、反応混合物を37℃でインキュベートし た。反応混合物の光学密度を37℃でインキュベート

68

し、7および16分後に測定した。 (PM2緩衝液) 1:100に希釈した正常ウサギ血清またはPM2緩衝 液のいずれかの50μlをウサギ抗ジゴキシン抗血清の

代りに加えた以外は比較試験管を同様に処理した。結果 を表8に示す。

[0225]

【表 8 】 **光学密度**

インキュベーション時間

	JOJAN DESCRIPTION		
<u>サンプル</u>	7分間	16分間	
抗ジゴキシン ^{&}	0. 475	0. 947	
NRS	0. 466	0. 954	
PM2 ^t	0. 457	0. 936	
基質プランク	0. 500	0. 057	

(a) 抗ジゴキシンはラビット539をさす (50 μ 1: PM2緩衝液で1:100希釈)。

(b) NRSは正常ウサギ血清をさす ($50\mu1:PM2$ バッファーで1:100希釈)。

(c) PM2緩衝液: O. 5M Na₂ HPO₄、pH
7. O、1mM Mg SO₄、O. 18mM Mn SO₄、
1mM EDTA、O. 02% NaN₃、O. 05%
トウーン(Iween) 20。

【0226】表8に示したように、あらかじめ重合した β - ガラクトシダーゼ(ジゴキシンH6およびEA23 酵素アクセプターの完全相補)による基質転化を抗体は 阻害しない。このようにエンザイム アッセイを使用し 40 て観察された基質転化の減少は抗体の阻害による相補の 結果であり酵素基質転化の減少の結果ではない。それゆえに、本発明による検定法の作用機構は、カストロおよびモンジ(Castro andMonji)により記載された β - ガラクトシダーゼを使用する立体障害エンザイムイムノアッセイとは類似しない(1981、メソッズ イン エンザイモロジー73:523-542(1981, Methods in Enzymology 73:523-542))。

【0227】<u>3.1. 酵素アクセプターを変化させることによる抗ジゴキシン抗体の相補性におよぼす効果</u>

ー連の実験において、ジゴキシンに対する特異抗体の阻害効果を実施例2、2および実施例8、1の記載のごとく調製した3つの酵素アクセプターおよび酵素ドナージゴキシン-H6結合体を使用して測定した。

【0228】反応混合物を次のように調製した:50μ 1PM2緩衝液;50μ1のPM2緩衝液中のジゴキシ ン-H6結合体の適切な希釈度(1:20,1:40, 1:80);50μ1の適切な抗体(すなわち抗ジゴキ シン抗体または正常ラビット血清のいずれか)および酵 素アクセプター(1×10⁻⁷M EA14,EA20ま たはEA22)および基質o-ニトロフェノール-β-D-ガラクトピラノシド(ONPG)(5mg/ml)の50μ 1の適切な混合物を微小力価プレートに加えた。プレー 50 トを37℃で所定期間インキュベートした。414nmに おける光学密度を5分間間隔で45分間測定した。

【0229】このシステムの抗体相補阻害効果は、酵素 アクセプター欠失の大きさに関係すると思われる。アミ ノ酸の13-40番目 (図7参照) を欠失し、かつこの 実験で試験した最も大きな欠失である酵素アクセプター EA22は、抗体により最も阻害されなかった。アミノ 酸の30-37番目 (図7参照) を欠失し、かつ試験さ れたグループの中で最も小さな欠失である酵素アクセプ ターEA14は、抗体により最も阻害された。アミノ酸 の26-45番目 (図7参照) から成り、大きさがEA 10 22とEA14の中間であるEA20は、相対的にそれ らの中間で阻害された。しかしながら、EA20の自然 な相補効率は、EA14またはEA22のいずれのそれ よりも少ない。酵素アクセプターは、2つの基準を満た さなければならない:(a) 自然な相補効率 (例えば、E A14およびEA22は、等モル濃度において図7に示 された他のものよりさらに効果がある) ;および(b) 相 補特異的検体結合タンパク質の阻害能。

【0230】<u>実施例9:第2抗体のジゴキシン酵素免疫</u> 検定における効果

上記実施例7、3に示した結果は、抗ジゴキシン抗体の本発明による酵素ドナージゴキシン結合体へのカップリングが酵素アクセプターと酵素ドナー結合体の相補速度を遅くするということを示す。しかしながら、そのようなカップリングは、完全には相補を妨害しない。実施例8、3で述べたように、このシステムは、酵素アクセプターと酵素ドナー結合体のほぼ15分間のインキュベー

ションで最も感度が高くなる。

【0231】そのシステムは、約15分間で最大吸収差に達する。その時抗ジゴキシン抗体が存在するシステムにおいて β - ガラクトシダーゼ濃度は、抗体が存在しないシステムまたはジゴキシン抗体が中和されるシステムの濃度と同じである(例えば、高ジゴキシンレベル)。 β - ガラクトシダーゼ濃度が同じであるため、基質転化率も同じである。付加的な吸収差は生じない。抗体の相補効果を制限する現象は、投与量応答曲線に対し狭い吸収範囲、平坦な傾き特性およびある診断法に対して不十分な検定感度を示す方法を提供する。

70

【0232】次の実施例は、抗ジゴキシン結合体抗体に 特異な第2抗体の付着が相補阻害を強めることを示す。 【0233】1. 完全第2抗体の付着

一連の実験において、 50μ 1のウサギ抗ジゴキシン抗体(1:1000に希釈)を、一組の微小力価ウエル中で 50μ 1のジゴキシン -H6(PH2緩衝液中で1:50に希釈)および0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 100ng/mlの範囲の 50μ 1のジゴキシンと結合させた。 50μ 1アリコートの第2抗体製剤(ベチルラボ,モントゴメリー,テキサス州,ヤギ抗ウサギ血清 $1:50\sim1:800$ (Bethyl Lab, Montgomery, TX, goat anti-rabbit serum 1:50-1:800))を各ウェルに加えた。結果を表9から表11に一覧表にする。

[0234]

【表9】

第2抗体の基質転化率に及ぼす効果

基質転化率 (OD 414 / 時間) 8 0-16分間 16-30分間 35-40分間 45-60分間

希釈 ^b 第2抗体	OD/時間	% 第1 <u>抗体</u>	<u>OD/時間</u>	% 第1 <u>抗体</u>	00/時間	% 第1 <u>抗体</u>	<u>OD/時間</u>	% 第1 <u>抗体</u>
1, 50	0. 002	67	0. 004	57	0. 005	39	0. 006	40
1. 75	0, 002	67	0. 004	57	0.007	54	0. 009	60
1. 100	0, 002	57	0, 006	86	0.009	69	0. 011	73
1. 200	0. 003	100	0. 007	100	0.012	92	0.013	87
1. 300	0.003	100	0. 007	100	0.012	92	0. 014	93
1. 400	0. 003	100	0. 007	100	0.013	100	0. 014	93
1.800	0, 003	100	0. 007	100	0.013	100	0. 014	93

- (a) すべての場合において、第2抗体なしで第1抗体を使用する検定系による 基質転化率を100%とした。この製剤の測定された割合($0D_{414}$ /時間) は、0-16; 16-30; 30-45; および45-60分において各々 0.003, 0.007, 0.013, 0.015であった。
- (b) 使用した第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体 (ベチル ラボ, モントゴメリーテキサス(Betyl Labs, Montgonery TX)) であった。希釈はすべてPM2緩衝液を使用して調製した。第1抗体は、1:1000ですべて希釈したウサギ抗ジゴキシン抗体であった。

【0235】表9に示されるように、第2抗体を抗体-ジゴキシンH6結合体に付着することにより達成される相補阻害効果は、第2抗体の1:50希釈またはそれ以下で最適である。第2抗体の1:200~1:3000 30

希釈において、全ての相乗阻害が失なわれた。第2抗体

ありまたはなしの相補阻害は、この希釈においてまたは それ以上においても同じである。

[0236]

【表10】

第2抗体の基質転化率に及ぼす効果

		基	質	転 化	2 \$ 3
		0-16	分間	16-30	分間
2	希釈 ^b				
第 1	第 2		96		%
抗体	抗体	00/時間	最大	0D/時間	<u>最大</u>
R α D g	~	0. 002	50	0. 007	70
NRS	_	0.004	100	0. 010	100
· RaDg*	1:5	0.004	100	0.007	54
NRS	1:5	0. 004	100	0. 013	100
RaDg"	1:10	0. 004	100	0. 005	39
NRS	1:10	0. 004	100	0. 013	100
RαDg*	1:20	0. 003	60	0.003	25
NRS	1:20	0, 005	100	0. 012	100
R α D g	1:40	0. 002	40	0. 003	.25
NRS	1:40	0, 005	100	0. 012	100
R α D g	1:80	0. 001	20	0. 004	36
NRS	1:80	0.005	100	0. 011	100
Ra Dg	1:160	0. 002	50	0. 006	50
NRS	1:160	0.004	100	0. 012	100

*ウェル中の製剤

- (1) 第1抗体は、PM2緩衝液で1:1000に希釈したウサギ抗ジゴキシン($R\alpha D_g$)または正常ラピット血清(NRS)のいずれかであった。
- (b) 第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体を示す。

[0237]

【表11】

第2抗体の基質転化率に及ぼす効果

•		基	質	転 化	2
		30-45	分間	45-60	分間
a	希釈 ^b ·	~			
第1	第 2		%		96
<u>抗体</u>	抗体	0D/時間	最大	00/時間	<u>最大</u>
RaDg		0. 010	71	0.010	77
NRS	_	0. 014	100	0.013	100
· R & Dg*	1:5	0. 003	23	0. 003	23
NRS .	1:5	0. 013	100	0. 013	100
R or D g **	1:10	0. 003	21	0. 003	21
NRS	1:10	0. 014	100	0. 014	100
RαDg*	1:20	0. 003	21	0. 003	21
NRS	1:20	0. 014	. 100	0. 014	100
R α D g	1:40	0. 003	21	0. 004	29
NRS	1:40	0. 014	100	0. 014	100
RαDg	1:80	0. 006	43	0. 006	43
NRS	1:80	0. 014	100	0. 014	100
RαDg	1:160	0. 009	60	0. 009	60
NRS -	1:160	0. 015	100	0. 015	100

*ウェル中の製剤

- (a) 第1抗体は、PM2緩衝液で1:1000に希釈したウサギ抗 ジゴキシン(RαDg) または正常ラピット血清 (NRS) の いずれかであった。
- (b) 第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体を示す。

【0238】表10および表11で示されるように、第 2 抗体なしでは基質転化率(すなわち、β-ガラクトシ ダーゼ濃度)は30分間以内で最大70%に達した。 1:40の希釈で第2抗体を有する場合には、基質転化 率は最大約25%であった。第2抗体が1:40希釈よ りも大きい場合において、相補阻害効果は、時間ととも に基質転化率が増加することによって明らかなように、 減少した。

【0239】1:40またはそれ以上の希釈において、 基質転化率が増加するという効果がある。

【0240】試験した第2抗体の全濃度において基質転 化率 (すなわちβ-ガラクトシダーゼ濃度) は、システ ムが許容するβ-ガラクトシダーゼの最大濃度以下のレ ベル (例えばNRSは第2抗体に代わる) で直線状とな った(すなわち、新規β-ガラクトシダーゼを産生しな い)。このことは、第2抗体の結合が第1抗体の立体障 害を高め、かつ結合する酵素ドナー集団による相補を完 全に妨げるということを示す。

ン - P 6

他の一連の実験において、エンザイムイムノアッセイの 感度を0, 1, 10, 100, 1000ng/ml範囲の濃 度のジゴキシン(検体)、酵素アクセプターEA14、 ウサギ抗ジゴキシン抗体および第2抗体としてのヤギ抗 ウサギ抗体を使用して測定した。これらの実験において ジゴキシン-H6結合体(実施例8)およびEA14酵 素アクセプターで記載した方法と類似方法で調製した酵 素ドナージゴキシン- P6を様々な組合せの濃度で使用 した。各ケースにおいて次の方法を使用した:微小力価 形態において、各々50μ1のジゴキシン- Ρ6、遊離 ジゴキシン検体および抗ジゴキシン抗体を順次加えた。 その後、50μ1のヤギ抗ラビット(1:80)を加え た。プレートを室温で10分間インキュベートした。そ の後、各々50μ1の適切な希釈の貯蔵品ΕΑ14 (2. 64×10⁻⁵M) およびo-ニトロフェニル - β-D - ガラクトピラノシド(galactopyranoside) 基質 (5 mg /ml) を加えた。プレートを37℃で再びインキュベー 【0241】1.1.投与量応答:EA14とジゴキシ 50 トし、反応混合物の吸光度を15分、30分に測定し

た。基質ブランクの吸光度を全サンプルから引いた。 【0242】図14に示された図の結果は、ジゴキシン 検定使用に適する服用量応答曲線を示す。

【0243】2. 第2抗体フラグメントの付着

第2抗体が第1抗体- 酵素ドナー結合体とカップリング したときに観察された阻害の高揚が沈降素複合体中の酵 素ドナー結合体の立体障害またはエントラップメントに 帰するかどうか決定するために、ヤギ抗ウサギ免疫グロ ブリンの単価Fabフラグメント(約50,000ダルト ンMWの抗原結合フラグメント)を第2抗体として使用 10 した。 Fabフラグメントが抗原と架橋できないために沈 降または凝集反応を誘導することはできない。この製剤 で観察された相補のいかなる阻害も、相補に対する高め られた立体効果によるものであって結合体の高められた エントラップによるものではない。

【0244】微小力価プレート形態において、各々50 μ l のジゴキシン (0, 1, 4, 10, 1000ng/m * *1);ジゴキシン-H6結合体;ウサギ抗ジゴキシン第 1抗体(1:4000)および1:80希釈の第2ヤギ 抗ウサギ抗体 (ベチル ラブス, モントゴメリー, テキ サス(Bethyl Labs, Montgomery, TX))を5つ等しく加え た。希釈はすべてPM2緩衝液中であった。第2抗体を 正常ウサギ血清 (1:80) および1:10, 1:2 0, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320希釈 のヤギ抗ウサギ血清のFabフラグメント (カッペル ラ ボラトリーズ, ウエストチェスター, ペンシルバニア(C appel Laboratories, West Chester, PA)) で置換した。 1 0分間室温で放置後、50μlの1×10-6M EA1 4および5mg/mlの基質ONPGを加え、37℃で30 分間インキュベートした。OD414 を測定し、結合/最 大結合 (B/Bmax)を決定した。

78

【0245】結果を表12に示す。

[0246]

【表12】

FAB フラグメント効果

基質転化率

第2抗体製剤 の希釈

ジゴキシン濃度

	_0	_1	_4	10	1, 000
ヤギ抗ウサギ l g G ^b	56. 7	66. 3	81. 9	94. 0	100
なし「	95. 4	91. 3	88. 7	97. 1	100
Fabl:10ヤギ抗ウサギlgG ^d	62. 8	68. L	75. 2	89. 4	100
Fab1:20ヤギ抗ウサギIgG ^d	57. 6	67. 6	75. 5	87. 1	100
Fab1:40ヤギ抗ウサギIgG ^d	66. 2	73. 8	80. 0	90.3	100
Fab1:80ヤギ抗ウサギIgG ^d	69. 7	75. 6	82. 3	91. 5	100
Fib1: 160ヤギ抗ウサギlgG ^d	77. 4	78. 5	83. 1	92. 1	100
Fib1: 320ヤギ抗ウサギIgG ^d	81. 6	83. 5	B5. 1	94. 8	100

- (a) 第2抗体製剤を全て1:4000希釈の第1抗体を使用して試験した。
- (b) ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗血清(ベチル ラブス,モントゴメ リー、テキサス (Bethyl Labs, Montgomery, TX))。
- (c) なしは第2抗体を使用しなかったことを示す。正常ウサギ血清の1: 80希釈は試料中の第2抗体と置き換えた。
- (d) Fabヤギ抗ウサギ I g G は、HおよびL Sp から得られたFab フラグメントを示す (カップル 0412-0081 ロット ナンバー23167 (Cappel 0412-0081 Lot # 23167)) (カッペル ラボラトリーズ, ウェスト チェスター、ペンシルバニア (Cappel Laboratories. West Chester, Pa)) .

【0247】表12に示すようにヤギ抗ウサギ免疫グロ ブリン (Fabフラグメント) が第1抗体酵素ドナー結合 体とカップリングする際に明らかに相補性が減少する。

全部を使用する際に観察された阻害とほぼ同等である。 【0248】表12に示されるように第2抗体は、高投 **与量(すなわち、過剰の遊離検体により引き起こされる** Fabフラグメントにより誘導される相補の阻害は、抗体 50 より少ない抗体酵素ドナー相互作用)より小投与量(す

なわち、より大きな抗体/酵素ドナー相互作用)におい て大きな相補阻害効果を示した。

【0249】Fab濃度が減少すると、相補阻害が直線的 に減少した。表9でそのままの分子は、1:40より大 きな希釈で有効に第2抗体を減少することを示した。同 様に、Fab製剤の1:40の希釈で同様の現象が始まる ことが判る。

【0250】<u>3. 検体特異抗体による相補阻害:ED-</u> ジゴキシン結合体の比較

特異的検体抗体による相補活性の特異的阻害に関して の、各種ED- ジゴキシン結合体の比較を行なった。下 に示す実験においてEA22をカップリングした酵素ド ナーの相補活性を標準化した。各種EDのジゴキシン結 合体を、カップリング時の pHを pH9. 5まで上昇さ せてジゴキシン- マレイミドをα- アミノ基およびα-領域へのシステイン末梢の両方へカップルするED4 (2-ジゴキシン) を用いることを除いては前記のように 調製した。抗ジゴキシン抗体およびヤギ抗ウサギ抗体濃 度の両者を標準化した。その結果を表13に示す。

[0251]

【表13】

検体特異抗体による相補の抑制

-			
酵素ドナ	相補の抑制	(%)	
ED5	66		
ED4	(2-ジゴキシン) 68		
ED4	51		
н6	. 37	*	
	, 酵素アクセプター	(EA22)	0. 625×10^{-7} M
	第174抗体		1/1200
	サリチル酸塩	•	l OmM
	酵素ドナー (E D	4-T4)	1/276
	第2ヤギ抗ウサギ	抗体	1/200
	ONPG		0. 51 mg/ml

【0255】900秒で読みとった。各患者のT4サン プルを使用する際には0.D./分の変化は、個々の患者の サンプルを分けて0.D. 405 で±50 m0.D. 投入量によっ てプロットすべきである。図26は、すべてヒト血清中 40 で調製された検量物質によるT4検定を示す。900秒 での検量物質間の吸光度の変化を血清T4濃度に対して プロットする。

【0256】ジゴキシン検定をED5およびEA22お よびベーカーエンコリー(Baker ENCORE (登録商標)) 遠心分離分析器を用いて改善した。ジゴキシン標準がヒ

*【0252】実施例10:第2抗体を使用する改良され たチロキシンおよびジゴキシン検定

ያስ

チロキシンおよびジゴキシン酵素相補性免疫検定を第2 抗体を使用して行なった。

【0253】さらにチロキシン (T4) 検定をEA22 およびED4を使用しベーカーインスツルメンツ (Baker Instruments) (アレンタウン、ペンシルバニア(Allen town, PA) 製遠心分離分析器、エンコアー (ENCORE (登録 商標)) で改良した。その検定系は、10μ1の患者の サンプル、抗T4抗体およびサリチル酸塩を含んだ10 0 μ 1 の酵素アクセプター試薬、および第2ヤギ抗ウサ ギ抗体および基質ο-ニトロフェニル - β-D- ガラクトピ イラノサイド (ΟΝΡG) を含む290μ1の酵素ドナ 一試薬を含む。その最終システム濃度は表14のようで あった:

[0254]

【表14】

ト血清において調製された。アッセイは、30μ1の血 清、200μ1のED5- ジゴキシン試薬および100 μ 1のΕΑ22試薬を含む。ΕD5- ジゴキシン試薬 は、基質o-ニトロフェニル - β-D- ガラクトピラノサイ ドおよびヤギ抗ウサギ抗体を含んでいた。EA22試薬 はウサギ抗ジゴキシン抗体を含んでいた。最終システム 濃度は表15のようであった:

[0257]

【表15】

20

血清

EA22

ED5- ジゴキシン

第1ジゴキシン抗体

第2ヤギ抗ウサギ抗体

ONPG

9.1% 2×10^{-7}

1:1500

1:59,400

1:200

0.5 mg/ml

【0258】この検定の標準的な曲線を図27に示す。 【0259】<u>実施例11:遺伝子工学的および化学的に</u> 10 合成された酵素ドナーのジゴキシン免疫検定性能比較 化学に合成された成分と遺伝子操作された成分とを使用 した酵素免疫検定を比較するために、2つの類似酵素ド ナー、すなわち1つは組換DNA技術によるものであ り、他は化学ペプチド合成によるもの、を調製した。遺 伝子操作により生産したED3 (実施例1、1.4参 照) およびポリペプチド合成により生産したED3A (実施例1、1.5参照)のアミノ酸配列を図18に示 す。これら2つのペプチドの顕著な特徴は、検体への化 た類似システイン残基 (Cys) とED3のアミノ酸番号 12と50の間に位置し、ED3Aのアミノ酸番号5と 43α間に位置するものを含み野生-タイプβ-ガラク トシダーゼの対応するアミノ酸の6~44番目を含む類 似 α- ドナードメインである。

[0260]ジゴキシン α ED3およびED3Aへの結 合を実施例8、1に記載の3-o[m-マレイミドフェニルカ ルバミル]ジゴキシゲニンを用いて行なった。ED3、 ED3A、ジゴキシン -ED3およびジゴキシン -ED 3A製剤を溶離液として0.1%TFAを含む水中の0 ~80%のアセトニトリル濃度勾配を使用した調製用H PLCヘニル カラム(henylcolumn)[ウォーターズ μ ボンダパック, ウォーターズアソシエート, ミルフォ

ード, マサチューセッツ (Waters μ Bondapak, Water As soc., Milford, MA)) を有する高速液体クロマトグラフィ ー (HPLC) にかけた。各酵素ドナーのカラム分画を 酵素アクセプターとしてM15を使用して実施例1、 2. 1に記載の相補性を検定した。ED3- ジゴキシン の相対的な相補効率はED3A- ジゴキシンの4倍であ

82

【0261】ジゴキシン -ED3およびジゴキシン -E D3Aに対応するカラム分画を別々にプールし、ジゴキ シンに関する競合的酵素免疫検定を比較した。

【0262】96ウェル微小力価プレートを使用して検 学カップリングに使用され、図18において星印を付し 20 定した。検定は、25μ1のヒト血清標準0,0.5, 1, 2, 4, 10, 100および1000ng/mlジゴキ シン、4×10⁻⁷モル M15酵素アクセプターおよび ジゴキシン抗体を含む100μ1の試薬Ι、および13 Oμlの試薬IIを含んでいた。試薬IIは、各種希釈 されたジゴキシン - ED3またはジゴキシン - ED3 A、第2ヤギ抗ウサギ抗体および1. 1 mg/mlのo-ニト ロフェニル -β-D- ガラクトピラノシドを含んでいた。 37℃において30分間インキュベートした後の結果お よびタイターテック(Titertek)微小力価プレートリーダ における405nmの読みを表16および表17に示す。

[0263]

【表16】

ED3およびED3Aを用いるジゴキシン検定

結合体希	釈			ジゴキシ	ン服用量	n g / 1	ml	
	_0	0. 5	_1	_2	_4	10	<u>_100</u>	<u>1 k</u>
				ED3	(絶対OD)			
1/100	0.810	0.821	0.855	0.916	O. 98D	1. 088	1. 159	1. 218
1/200	0.350	0.368	0. 386	0.420	0. 444	0.508	0. 566	0. 586
1/400	0.154	0.149	0. 163	0. 178	0. 189	0. 230	0. 249	0. 264
1/800	0. 080	0. 078	0.084	0.095	0.090	0. 114	0. 133	0. 121
				ED3A	(絶対00)			
1/100	0.668	0.656	0.660	0.660	0. 668	0.719	0.757	0. 777
1/200	0.310	0. 306	0.309	0. 322	0.329	0. 352	0. 372	0. 375
1/400	0.146	0.146	0. 153	0. 152	0. 151	0. 192	0. 180	0. 180
1/800	0. 043	0. 039	0.047	0. 043	0. 048	0.060	0.064	0. 052

[0264]

20【表17】 ED3およびED3Aを用いるジゴキシン検定

結合体希釈	_			ジゴキシ	ン服用量	ng/1	nl	
	_0	0. 5	_1	_2	_4	<u>10</u>	100	<u>1t</u>
			•	ED3 (D)			
1/100	0	0. 011	0.045	0.106	0.170	0. 278	0, 349	0.408
1/200	0	0.018	0.036	0.070	0.094	0. 158	0. 216	0. 236
1/400	0	0.005	0.009	0.024	0.035	0.076	0. 095	0. 110
1/800	0	0.002	0.004	0. 015	0.010	0. 034	0.053	0. 041
				ED3A	(OD)			
1/100		012	008	008	0	0.051	0. 089	0. 104
1/200		004	001	012	0.019	0.042	0.062	0.065
1/400		0	0.007	0.006	0.005	0.046	0. 034	0. 034

【0265】表16および表17にみられるように、競 3 Aの両者で生じた。ジゴキシン - ED3 Aを使用する ジゴキシンに関する曲線を図25に示す。ジゴキシン-ED3を使用するジゴキシン免疫検定は、ジゴキシン -ED3Aより 0.5および1mg/mlの低投与量におい てより良好な信号識別性を与える。この差異は、HPL C分析中に検出されたED3A製剤中の不純物の存在に よるだろう。

【0266】これらの実験は、抗原抗体反応によるβ-ガラクトシダーゼポリペプチドの相補の制御に遺伝子操

ることを示す。化学ポリペプチド合成は、高分子量タン 合的免疫検定がジゴキシン -ED3とジゴキシン -ED 40 パク質検出を目的とする酵素ドナーを生産するために使 用し得る。α-ドナードメインに融合した免疫学的に反 応に富むポリペプチドエピトープをコード化する遺伝子 融合物も合成し得る。この解決法の限界は、より大きな ポリペプチドを合成する技術の可能性の状況ばかりでな く必要としたα-ドナードメインおよび免疫学的反応性 たん白質ドメインの両者の配列に関する知識をもたない ことである。

【0267】<u>微生物の寄託について</u>

表18に挙げられたプラスミドを有する次のエシェリキ 作されたポリペプチドと同様に合成ペプチドが用いられ 50 ア・コリ(E.Coli)菌株は、イン ビトロ インターナシ

ョナル, インコーポレーテッド, (IVI), アン アーバー, ミシガン州(In Vitro International, Inc. (IVI), Ann Arbor, MI) またはザ アグリカルチュラル リサーチ カルチャー コレクション (NRRL), ペオリア, イリノイ州(the Agricultural Reseach Culture *

*Collection(NRRL), Peoria, IL) に寄託され、次の受託番号を指定された:

[0268]

【表18】

エシェリキア	プラスミド	受 託 番 号
コリ菌株		
E9001	p122	171 10034
E9001	p125	IVI 10035
E9001	pF29	IVI 10038
JM83	p150	IVI 10036
JM83	p157	IVI 10037
AMA 1004	pMG14	IVI 10050
AMA 1004	pMG22	IVI 10051
E9001	p169	IVI 10052
E9001	p183	IVI 10053
£9001	p185	IVI 10054
AMA 1004	p175	NRRL-B18006

【0269】エシェリキア・コリ(E. Coli)菌株E900 1、IVI 10034および菌株JM83、IVI 10037は、それぞれプラスミド p122および p1 57を含み、実施例3、1および実施例4で記載した一 部のB型肝炎ウィルス表面抗原およびα- ドナーの融合 タンパク質をコードする遺伝子を有する。エシェリキア ・コリ(E. Coli) 菌株E9001、IVI 10035 は、プラスミド p125を含み、実施例1、1.1に記 載のように酵素ドナーをコードする遺伝子を有する。エ シェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10038 および菌株JM83、IVI 10036は、それぞれ プラスミド pF 2 9 および p1 5 0 を含み、実施例 1、 2の記載のように p150が酵素アクセプターをコード する遺伝子を有する。エシェリキア・コリ菌株AMA 1004、IVI 10050は、アミノ酸の30~3 7番目を欠失したβ-ガラクトシダーゼタンパク質(酵 素アクセプター) に関する遺伝子を有するプラスミド p MG14を含む。図7参照。エシェリキア・コリ菌株A MA 1004、IVI 10051は、アミノ酸の1 3-40番目を欠失したβ-ガラクトシダーゼたん白質 (酵素アクセプター) に関する遺伝子を有するプラスミ ドpMG22を含む。図7参照。エシェリキア・コリ菌 株E9001、IVI 10052は、アミノ酸の62 番目にシステイン残基、アミノ酸の64番目にリシン残 基を有するβ- ガラクトシダーゼのフラグメント (ED H6) をコードする遺伝子を有するプラスミドである

p169を含む。実施例1、2参照。エシェリキア・コ

リ菌株 E 9 0 0 1、 I V I 1 0 0 5 3 は、アミノ酸の3

番目にシステイン残基を有する β - ガラクトシダーゼのフラグメント (ED3)をコードする遺伝子を有するプラスミドである p183を含む。実施例1、1.4参照。エシェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10054は、アミノ酸の39番目にシステイン残基を有する β - ガラクトシダーゼのフラグメント (ED5)をコードする遺伝子を有するプラスミドである p185を含む。実施例1、1.6参照。エシェリキア・コリ菌株AMA 1004、NRRL B-18006は、実施例6および図28に示したB-hCGタンパク質のカルボキシ末端および α - ドナーの融合タンパク質をコードする遺伝子を有するプラスミドである p175を含む。

【0270】本発明は、寄託された微生物による範囲に限定すべきではない。なぜならば寄託された実施態様は本発明のある態様の一例を示そうとするものであり、かつ機能的に等価などんな微生物も本発明の範囲内であるからである。事実、さらにここに示しかつ記載する本発明の各種の変形は当業者には前記および添付図面から明らかになるであろう。かかる変形は添付請求の範囲の範囲内に入ることを意味する。

【0271】ヌクレオチド用に与えられた塩基対 (bp) の大きさの全ては概算であり、記述のために使用されることも理解される。

[0272]

【発明の効果】上記したように、本発明の酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドを用いることにより、高い感受性で、150~30,000ダルトンの広範囲の分子量を有する検体の定量分析が可能

である酵素相補性検定法が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 β - ガラクトシダーゼポリペプチドを、自然界 に知られる欠失変異体M15、M112およびX90と 共に図解的に表わすものである。また選択臭化シアン (CNBr) 開裂ペプチドCNBr2、CNBr2/3 -41およびCNBr24が表わされる。

【図2】検体カップリングドメインを含む種々の組換え プラスミドの構築を表わすものである。ただし、図2A ~Dは一定の比率に拡大して描かれたものではない。

【図3】 α- ドナードメインおよびB型肝炎ウィルス表 面抗原 (HBV-SAg)あるいはB型肝炎ウィルスコア 抗原からなるタンパク質ドメインからなるN-末端および C-末端融合タンパク質を図解的に示すものである。

【図4】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素 - ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものであ る。図4において、*は、検体へカップリングするのに 有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図5】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素 - ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものであ る。図5において、*は、検体ヘカップリングするのに 有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図6】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素 - ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものであ る。図6において、*は、検体へカップリングするのに 有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図7】β- ガラクトシダーゼ遺伝子のα- 領域中に導 入される欠失部分を示すポリペプチド酵素- アクセプタ ーを表わすものである。比較のために、公知の欠失変異 体M15およびM112も示される。

【図8】天然のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子DNAおよ びアミノ酸配列を示すものである。

【図9】検体- 結合タンパク質がアビジンであるビオチ ンのための均質系の検定法に関する競合的結合曲線を示 すグラフである。

【図10】検体- 結合タンパク質がアビジンであるビオ チンのための検定法に関する競合的結合曲線(投与量応 答曲線)を示すグラフである。

【図11】検体- 結合タンパク質がアガロース固定化ア ビジンである酵素- ドナーCNBr2と酵素- アクセプ 40 ターEA23の相補の阻止を例示する競合的結合曲線を 示すグラフである。

【図12】5×10⁻⁸Mに固定されたEA23および 1:20と1:30希釈の酵素-ドナー結合体で得られ た投与量応答曲線を表わすものである。

【図13】1×10⁻⁷Mに固定されたEA23および 1:20と1:30希釈の酵素-ドナー結合体で得られ た投与量応答曲線を表わすものである。

【図14】第二抗体、ヤギ抗ウサギ抗体が、相補プロセ スにおいて酵素- ドナー結合体との抗体相互作用の阻害 50 効果を高めるために用いられるジゴキシンのための免疫 検定法に関する投与量応答曲線を表わすものである。

88

【図15】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を 示す、プラスミド p169の図解的表示である。ただ し、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図16】ED1およびED3に関しコードする遺伝子 の部位のヌクレオチド配列を表わすものである。関連ア ミノ酸配列および制限酵素開裂部位が示される。 ED3 N-末端フラグメントのCys (システイン) 残基における 10 星印は検体カップリング残基を示すものである。

【図17】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を 示す、 p180シリーズのプラスミドの図解的表示であ る。ただし、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図18】ED3およびED4のアミノ酸配列を表わす ものである。Cys残基上の星印は、検体カップリング残 基を示すものである。

【図19】図19AおよびBは、それぞれED酵素ドナ ー、ED3およびED4のアミノ酸配列を示すものであ る。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示 20 す。

【図20】図20AおよびBは、それぞれED酵素ドナ 一、ED5およびED7のアミノ酸配列を示すものであ る。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示

【図21】図21AおよびBは、それぞれED酵素ドナ 一、ED8およびED13のアミノ酸配列を示すもので ある。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を 示す。

【図22】図22AおよびBは、それぞれED酵素ドナ 30 一、ED14およびED15のアミノ酸配列を示すもの である。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基

【図23】それぞれED酵素ドナー、ED17のアミノ 酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体 カップリング残基を示す。

【図24】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を 示す、 p190シリーズのプラスミドの図解的表示であ る。ただし、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図25】ジゴキシン酵素免疫検定法におけるジゴキシ ン -ED3Aを用いるジゴキシンに関する滴定曲線を示 すグラフである。

【図26】ED4-T4、EA22および第二抗体を用 いるチロキシン (T4) 検定からの標準曲線を示すグラ フである。

【図27】 ED5- ジゴキシン、EA22および第二抗 体を用いるジゴキシン検定からの標準曲線を示すグラフ である。

【図28】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を 示す、プラスミド p166、 p175、 p177の図解 的表示である。ただし、一定の比率に拡大してしたもの

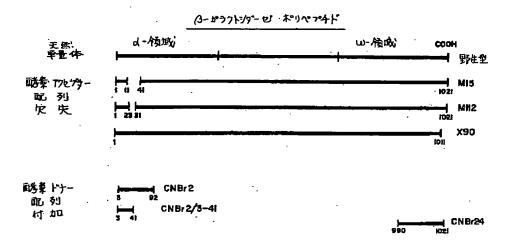
90

ではない。

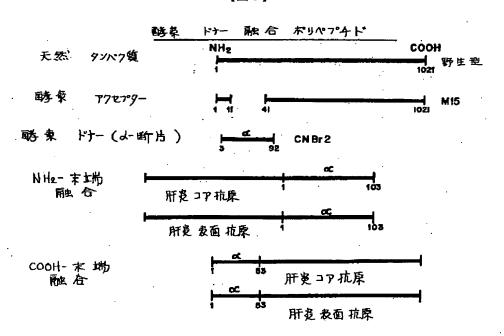
検定法に関する投与量応答曲線を表わすものである。

【図29】ヒト絨毛性ゴナドトロピンのための均質系の

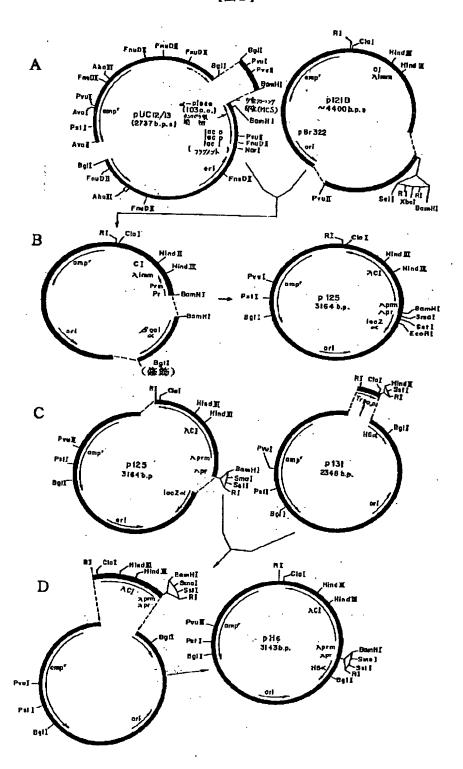
【図1】



【図3】



【図2】



【図4】

d-断片クローンの DNA WW アミノ酸配列

すれてのクローンの N 末端はなるようである:(除く p148)

H D P R A S S N S L A V
ATE GAT CCC CGG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC GTC

V L Q R R D W E N P G V
GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA GGC CCT GGC GTT

T E L N R L A A H P P F
ACC CAA CTT AAT CGC CTT GCA GCA CAT CCC CCT TTC

A S N R N S E E A R T
GCC AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG GCC CGC ACC

147

75.2)

着クローン の次の配列は次のようである

... D R P S Q Q L. L C* G V K* N9: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CTA TGC GGT GTG AAA

YRTDA-TAC CGC ACA GAT GCG TAA (17 7€) ■€)

D R P S Q Q L R S L C G B9: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTA TGC GGT

V K*Y R T D A -GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA {19 アマ・ 高島。)

【図6】

α一断片クローンのDNAおよびアミノ酸配列:

P198: ATG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGC CCA AGC TTG

A L A Y V L O R R D W E
GCA CTG GCC GTC CTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA

N P G V T O L N R L A A
ACC CCT GGC GTT ACC CAA CTT AAT CGC CTT GCA GCA

H P P F A S M R N S E E
CAT CCC CCT TTC GCC AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG

A R T D R P S Q Q 1 R S
GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC

L N G E W R L M R Y F L
CTG AAT GGC GAA TGG CGC CTG ATG CGG TAT TTT CTC

L S H L C* G I S H R I W
CTT AGC CTA CTG TGC GGT ATT TCA CAC CGC ATA TGG

C* T L S T 1 C* S D A D TGC ACT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCC GAC TAG

C AĞT ACA ATC TĞC TCT GAT GCC GAC TAG (98 72年) 前規。)

クローン	72) 哪	CYS*の位置	LYSOGE
H9	<u> </u>	56 (54)	58 (54)
B9	66	58	60
HG.	70	62	.64
P6	107	50.56	60.9D.105
P125	69	58	-
P148	95	8.77.85.91	-

【図5】

d-断片クローンの DNA WU TS1酸配列

B R P S O O L R S L N G
H6: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT GGC

E L C* G V K* Y R T D A GAA TTA TGC GGT GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA

(23 7性)。 酸)

P6: ATG CGG TGT GAA ATA CCG CAC AGA TGC GTA AGG AGA

K* Y R 1 R R S S A S S L

AAA TAC CGC ATC AGG CGC TCT TCC GCT TCC TCG CTC

T D S L R S V Y R L R R

ACT GAC TCG CTG CGC TCG GTC GTT CGG CGG

A V S A H S K* A V 1 R L

GCG GTA TCA GCT CAC TCA AAG GCG GTA ATA CGG TTA

S T E S G D N A G K* N H ~

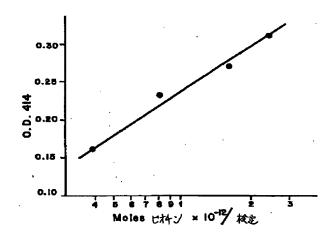
TCC ACA GAA TCA GGG GAT AAC GCA GGA AAG AAC ATG TGA (GO

(60 7注) 联·)

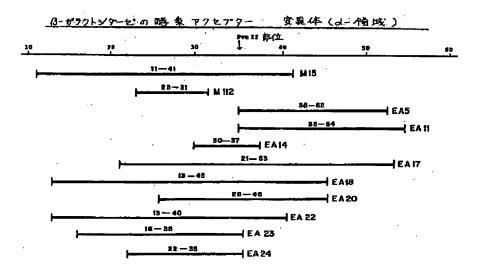
DRPS GG LRS L C~ L
P125: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTC TGC CTC

ARFG DDG ENLGCG CGT TTC GGT SAT GAC GGT GAA ACC CTC TGA (22
アミ)
可使 J

【図9】



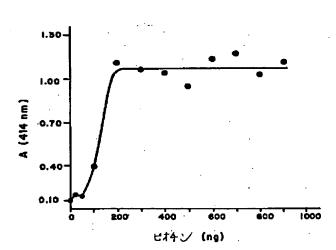
【図7】



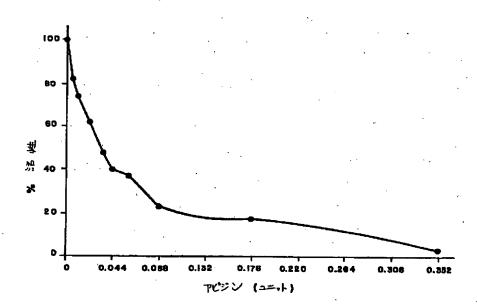
【図8】

A A H P P F A S W R N S E A GCA GCA CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT AGC GAA GAG GCC R T D R P S Q Q L R S L N G E ACC CAA CAG TTG CGC AAT AGC GAA GAG GCC R T D R P S Q Q L R S L N G E AAT GGC GAA GAG GCC GO L R F TTG CGC TTT

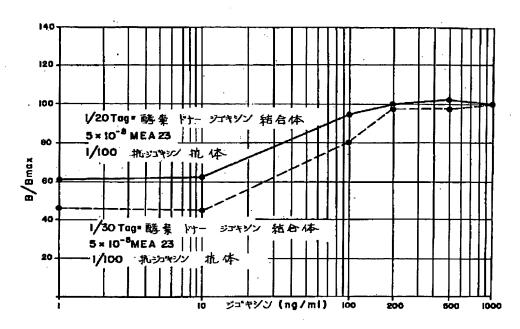




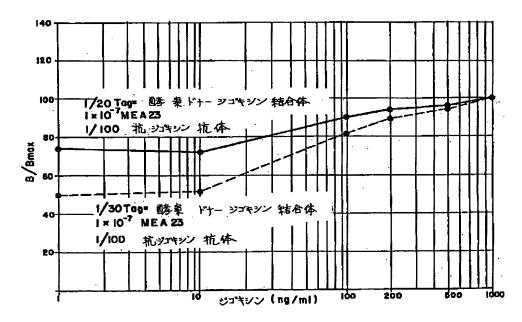
【図11】



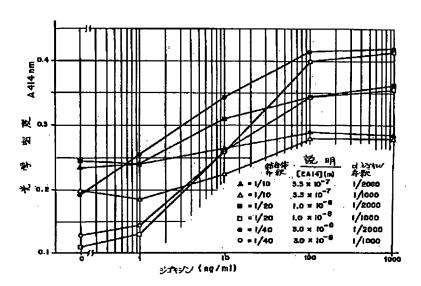
【図12】



【図13】

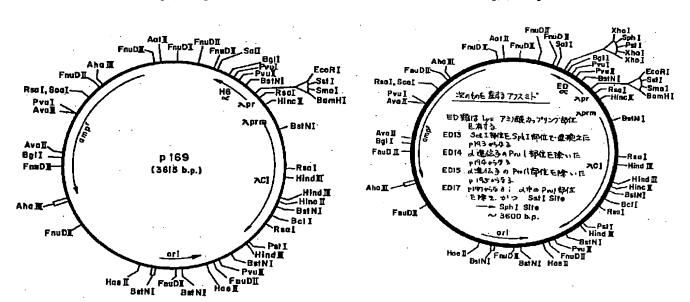


【図14】



【図15】

【図24】



Cys 11c Thr Asp

【図16】

【図18】

Gly Lea Glu Ser Ary Ser Ala Gly Het Pro Lea Glu - -

N末端 わがん

Met Asp Pro Ser Cly Asn Pro Tyr Cly Ile Asp Pro Thr Cln Ser Ser Pro Cly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser

Het Asp Pro Ser Gly Asp Pro Ang Ala Cys Ser

Sign II Son I Son I Son I Son I Son I Son II Son II Son III So

ä

Asp Pro Ser Gly Asp Pro Arg Ala Cys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gin Arg Arg Arg Trp Giu Asn Pro Gly Val Thr Giu Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Fine Als Ser Typ Ary Ann Ser Glis Glu Als Ary Thr Asp Ary Pro Ser Glis Glis Les Ary Ser Less Asm Gly Less Glu Ser Ary Ser Ala Cly Het Pro Leu Glu

EDIX

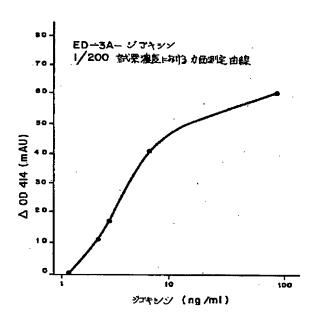
Ger Lau Ala Val Val Lau Gin Ary Ary Asp Trp Giu Aan Pro Gly Val Thr Gin Lau Aan Ary Lau Ala Ala His Pro Pro

The Ala Ser Trp Arg Ass Ser Olu Clu Ala Arg Thr

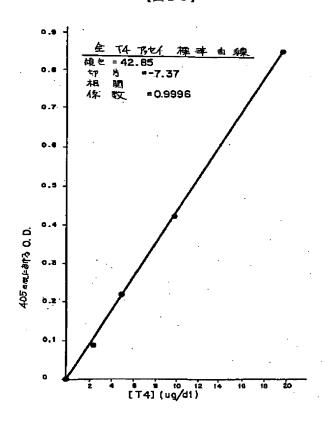
【図17】

Set I Smal BamHl FauD -Real -Hinc I Real, Scal Pvul., Ava I.p181--p189 -Bet N1 ED シテスプ Aval. Bgil p 181 (ED1) Bam—Smol~60b.p. p 183 (ED3) Sat1—Sph1 Rsa į FruDII p | 83 (EU3) SATE-SPII p | 84 (ED4) みゆの Prul EPP*1店 p | 85 (ED5) は ゆの Prul EPP*1店 p | 85 (ED5) は ゆの SSII→SAI, Prul EPP*1店 p | 88 (ED6) は中の BSIN | を除いた - Hind I Hind III Hincil BetN1 AhqII-(~Q.dOOb.p.) Bc11 FauDÍ BatNI BatNI Hael

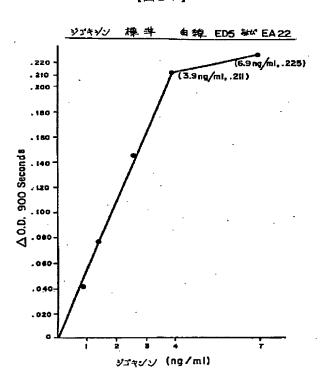
【図25】



【図26】



【図27】



【図19】

配列

ED3

Arg Ala Cys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gin Arg Arg Asp Trp Giu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Het Asp Pro Ser Gly Asp Pro

30 46 45 Arg Leu Ala Ala Bis Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu; Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ber Gln Gln

55 60 65 Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Mat Pro Leu Glu

ED4

Met Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro

5 20 25 Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gin Arg' Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 35. 40 40 50 Arg Leu Ala Ala Hie Pro Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Cys Pro Ser Gln Gln

55 50 50 Leu Arn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

【図20】

7%) 殿

配列

ED5

-5 Met Asp Pro Ser Gly Asp Pro

20 20 20 Arg Ala Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 30 45 50 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Cye Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln

65 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

<u>ED7</u>

_

0 Het Asp Pro Ser Gly Asp Pro

20 20 25 Arg Ala Cys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 45 50 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Cys Pro Ser Gln Gln

55 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu - [図21]

802

配列

四個

-5 Het Asp Pro Ser Gly Asp Pro

20 20 25 Arg Arg Arg Arg Arg Trp Glu Asn Pro Cys Val Thr Glu Leu Ann

30 45 50 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln

55 60 65 Leu Arg Ser Ala Gly Heu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

ED13

-5 Wet hap Pro Ser Gly Asp Pro Arg Ala Lys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 45 50 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asm Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln

55 60 65 Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Het Pro Leu Glu =

【図22】

Pシ) 酸 配列·

ED14

-20 -5 -15 Het Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro

5 10 25 Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Th<u>r Ag</u>p Lye Fro Ber Gln Gln

55 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

2015

Net Asp Pro Ser Gly Asp Pro

5 10 15 Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 35 40 40 43 Arg Fro Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Lys Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln

55 60 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Het Pro Leu Glu

【図23】

-5 0 Met Asp Pro Seri Gly Asp Pro

Arg Ala Lys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

30 30 35 45 50 50 50 Arg Leu Ala Ala Ala Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Lys Pro Ser Gln Gln

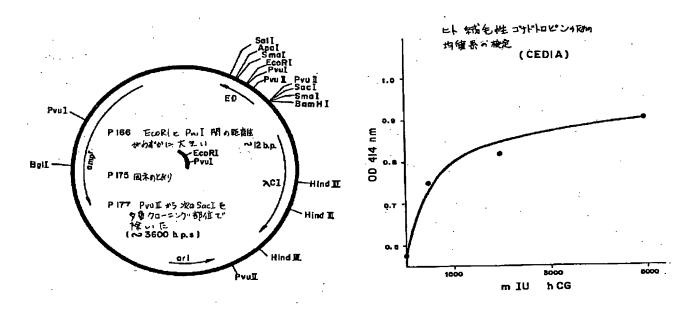
55 60 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

<u>ED17</u>

心殿 配列

【図28】

【図29】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6		識別記号	庁内整理番号	F I	₽	技術表示箇所
C 1 2 P	21/02	С	9282 - 4 B			
G 0 1 N	33/535					
•	33/542	В				
// C12N	9/38					
C 1 2 Q	1/34		6807 – 4 B			
(C12N	1/21					
C 1 2 R	1:19)					
(C 1 2 P	21/02					
C 1 2 R	1:19)					